

**Untersuchung
über
die Hämoglobinbildung
bei Patienten mit Colitis ulcerosa
unter der Therapie mit Äzulfidine[®]
unter besonderer Berücksichtigung
der Hämoglobinreduktase.**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von
Jochen Schmidt
aus Pössneck / Thür.
Marburg 1973

Aus der Medizinischen Universitätsklinik Marburg/Lahn.
(Direktor: Prof. Dr. med G.A. Martini)

Untersuchungen über die Hämoglobinbildung bei Patienten
mit Colitis ulcerosa unter der Therapie mit Azulfidine^R
unter besonderer Berücksichtigung der Hämoglobinreduktase.

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin der hohen Medizinischen Fakultät
der Philipps-Universität Marburg.



vorgelegt von
Jochen Schmidt
aus Pössneck/Thür.
Marburg 1973



Angenommen von der Medizinischen Fakultät
der Universität Marburg am 23.11.73

gedruckt mit der Genehmigung der Fakultät

Dekan: Prof. Dr. med. H. Oepen

Referent: Prof. Dr. med. A. Englhardt

Correferent: Prof. Dr. med. H. Kaffarnik



Digitized by the Internet Archive
in 2026

G l i e d e r u n g

A Einleitung

Teil 1 [Untersuchungen über die Hämiglobinreduktase]

I Methodik und Versuchsanordnung

II Ergebnisse

III Diskussion

IV Abbildungen und Tabellen

Teil 2 [Untersuchungen über die Hämiglobinbildung]

I Methodik und Versuchsanordnung

II Ergebnisse

III Diskussion

IV Abbildungen und Tabellen

B Zusammenfassung

C Literaturverzeichnis

D Anhang

A Einleitung

Unter Colitis ulcerosa versteht man eine nicht infektiöse, klinisch gut umschriebene,geschwürig-eitrige Dickdarm-entzündung mit Neigung zu Rezidiven und zweifelhafter Prognose.(Denning)Sie ist durch den tiefgreifenden,ausgedehnten geschwürigen Zerfall der Rektum-und Dickdarmschleimhaut,selten auch der unteren Dünndarmschleimhaut charakterisiert.

Sie befällt mehr oder weniger plötzlich Menschen aller Altersklassen.Bevorzugt ist der Zeitraum zwischen dem 20.und 40. Lebensjahr.

Die Ursache dieser Erkrankung,die von der harmlosen, ebenso larviert wie bland einsetzenden Proktokolitis bis zur septisch-toxisch fulminanten Entzündung alle Schattierungen zeigt,ist nach wie vor ungeklärt.(Hellner)Ein spezifischer Erreger ist unbekannt.Andere Theorien deuten die Colitis ulcerosa als allergische Entzündung,als Viruskrankheit oder als Ausdruck einer psychosomatischen Erkrankung.Zirkulierende und sessile Antikörper gegen Kolonmukosa wurden im wechselndem Ausmaß gefunden. Offenbar liegt aber eine einheitliche Ätiologie nicht vor.

Die Therapie besteht in einer Diät,die möglichst im Dünndarm vollständig resorbiert wird.Weiterhin werden Salicylazosulfapyridin (Azulfidine^R) und Steroide empfohlen.(Svartz 1941)(Denning)

Bei dieser Medikation mit Azulfidine^R zeigte sich eine vermehrte Hämoglobinbildung.Unter physiologischen Bedingungen ist der Hämoglobinanteil der Erythrocyten sehr klein,er beträgt nicht mehr als 0,5-1,0 o/o des gesamten Blutfarbstoffes,(Heubner 1947) da in den Erythrocyten eine ständige Reduktion des gebildeten Hämoglobins zu Hämoglobin vor sich geht.(Gibson 1948)(Scott 1960) Das Hämoglobin wird oxidiert,das bedeutet,das zweiwertige Eisen wird in das dreiwertige übergeführt.Das so gebildete Hämoglobin kann die physiologische Aufgabe des Hämoglobins nicht mehr erfüllen,da es nicht in der Lage ist,den Sauerstoff zu binden.Die Reduktion des drei-

wertigen zum zweiwertigen Eisen erfolgt durch die Hämi-
globinreduktase. Von dieser gibt es zwei, wobei die eine
unter Mitwirkung von NADH und die andere unter Mitwirkung
von NADPH, die Reduktion durchführt. (Scott 1962)

Meine Aufgabe bestand nun darin zu untersuchen, ob die
Hämoglobinbildung unter Azulfidine durch eine verminderte
Aktivität der Hämoglobinreduktase induziert wird.

Weiterhin sollte ich feststellen, ob die Hämoglobinbildung
in direktem Zusammenhang mit der Therapie mit Azulfidine
stand. und ob noch andere Parameter eine Einwirkung
haben.

Teil 1

Untersuchungen über die Hämoglobinreduktaseaktivität
menschlicher Erythrocyten und ihre Beeinflussung durch
Salicylazosulfapyridin (Azulfidine^R) und 4,4'-Diaminodi-
phenylsulfon (DADPS^R).

Es wurde berichtet, daß bei der Antimalariaprophylaxe in
Vietnam bei einzelnen Soldaten eine Hämoglobinbildung auf-
getreten ist, die auf eine Verminderung der Hämoglobinre-
duktaseaktivität zurückgeführt werden konnte. Diese Ef-
fekte waren allerdings nur bei Personen mit heterozygotem
Enzymdefekt nachweisbar. (Cohen). Es ist bekannt, daß auch
unter längerer Behandlung mit Salicylazosulfapyridin
(Azulfidine^R) und 4,4'-Diaminodiphenylsulfon (DADPS^R)
leichte Hämoglobinämien beobachtet werden. Auch über Heinz-
Körperbildung wird vielfach berichtet. (Spriggs) (Smith und
Alexander). Es wird diskutiert, daß diese Medikamente auf
die Hämoglobinreduktase über den Pentosephosphatshunt oder
über die Enzyme der Glykolyse wirken. (De Gowin).

Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß Hämoglobinbildende
Medikamente durch erhöhte Oxidation von Hämoglobin oder
Hemmung der Hämoglobinreduktase eine Hämoglobinämie hervor-
rufen können.

Aktivitätsbestimmungen des Enzyms Hämoglobinreduktase
könnten daher von praktischer Bedeutung sein. Es gibt nur
wenige Untersucher, die Testvorschriften für die Aktivi-
tätsmessung der Hämoglobinreduktase ausgearbeitet haben.

(Scott 1962) (Cohen) (De Gowin)

Die 1960 von Scott entwickelte und von Tönz weiter ausgearbeitete Methode wurde am häufigsten durchgeführt. (Scott 1960, Tönz 1962). Als Wasserstoffakzeptor wird in diesem Test ein Redoxfarbstoff, das 2,6-dichlorphenol-indophenol verwendet. Die Hämoglobinreduktase hat für dieses Substrat eine etwa 9000 fach höhere Affinität als für Hämoglobin. (Scott 1961)

Über das weitere Vorgehen im Test bestehen aber noch verschiedene Ansichten. Während einige Untersucher den Abfall des NADH im Ultraviolettlicht als Maß der Enzymaktivität empfehlen (Tönz 1968), verfolgen andere die Abnahme der Extinktion des 2,6-dichlorphenolindophenol (DCP) zur Aktivitätsbestimmung der Hämoglobinreduktase. (Scott). Optimierte Testbedingungen sind nur zum Teil angegeben worden. (Scott 1961). Eine besondere Schwierigkeit entsteht dadurch, daß die Reaktion aus verschiedenen Teilreaktionen besteht, die nicht in stöchiometrischer Beziehung stehen. Es wurde daher die Reaktionskinetik des Testes nochmals geprüft und die Hämoglobinreduktaseaktivität bei behandelten Patienten gemessen.

Es wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

1. Messung der Hämiglobinkonzentration in menschlichen Erythrocyten.

α bei Normalpersonen

β bei Patienten unter der Therapie mit Azulfidine^R

γ bei Patienten unter der Therapie mit DADPS^R

2. Untersuchungen zur Reaktionskinetik der Hämoglobinreduktase.

α Teilschritte des Testablaufes

β Reaktionen der Reagentien miteinander

γ optimales pH

δ Variation der NADH Konzentration

ε Variation der DCP Konzentration

3. Messung der Hämoglobinreduktase

α Normalpersonen

β bei Patienten unter der Therapie mit Azulfidine^R

γ bei Patienten unter der Therapie mit DADPS^R

4. Messung der Hämoglobinreduktion nach Zusatz von Natriumlaktat.

α bei Normalpersonen

β bei Patienten unter der Therapie mit Azulfidine^R

γ bei Patienten unter der Therapie mit DADPS^R

5. Versuch einer Vereinfachung bei der Messung der Hämoglobinreduktaseaktivität.

I Methodik und Versuchsanordnung

1. Messung der Hämiglobinkonzentration in menschlichen Erythrocyten.

Prinzip:

Die Hämiglobinkonzentration in den Erythrocyten wurde nach Evelyn und Malloy (Evelyn und Malloy 1938) aus Venenblut oder Kapillarblut bestimmt.

Gemessen wird das Verschwinden der Absorptionsbande bei 630 nm, das durch Umwandlung von Hämiglobin in Cyanhämiglobin unter Zusatz von Kaliumcyanid erfolgt. Die Änderung der optischen Dichte ist direkt proportional der Hämiglobinkonzentration. Der Wert wird ausgedrückt in Prozent einer Kontrollprobe, in der das gesamte Hämoglobin durch Zusatz von Kaliumhexacyanoferrat III $K_3Fe(CN)_6$ in Hämiglobin umgewandelt wurde.

Reagentien:

Kaliumhexacyanoferrat III $K_3Fe(CN)_6$ Merck 4973 p.A.
0.15 M (

Kaliumcyanid KCN Merck 4967 p.A.
0.38 M

Phosphatpuffer nach Sörensen pH=7,5
0.06 M

Durchführung:

0.2 ml Blut werden mit 5.0 ml Aqua dest. hämolysiert. Nach 5 Minuten wird das Stroma abzentrifugiert. Der klare Überstand wird zu 5.0 ml verdünnten Phosphatpuffer (1:1 mit Aqua dest.) gegeben und nochmals 5 Min. zentrifugiert.

Je 1.0 ml des Überstandes wird in eine Halbmikroküvette (d=1.0 cm) pipettiert. [Küvette A und B]

In Küvette A werden 20 μ l $K_3Fe(CN)_6$ pipettiert. Nach frühestens 10.0 Minuten wird die Extinktion beider Küvetten bei 630 nm gemessen. Anschließend wird in jede Küvette je 20 μ l KCN pipettiert und nach mindestens

5.0 Minuten die Extinktion bei 630 nm abgelesen.

Die Berechnung erfolgt nach:

$$\frac{E(B_1) - E(B_2)}{E(A_1) - E(A_2)} \times 100 = \text{o/o Hämoglobin}$$

2. Bestimmung der Hämoglobinreduktase in menschlichen Erythrocyten.

Prinzip:

Das Enzym wird zunächst durch NADH reduziert. Dieses reduzierte Enzym ist nun seinerseits fähig, weitere Substrate zu reduzieren (Jaffe 1964) (Tönz 1968) unter anderem 2,6-dichlorphenolindophenol-Na (DCP), Cytochrom C, und Hämoglobin. (Scott 1962). Die Reaktion wird interpretiert als schnelle Reduktion des Enzyms gefolgt von einer langsameren Reduktion des Akzeptors. (Scott 1962). Nach neueren Untersuchungen ist zwischen der Hämoglobinreduktase und dem Hämoglobin noch Cytochrom b_5 eingeschaltet. (Hultquist). Die Hämoglobinreduktase nennen diese Autoren daher Cytochrom b_5 -Reduktase. Maß der Enzymaktivität ist entweder die Abnahme der Extinktion durch die Oxidation des NADH [366 nm] oder die Abnahme der Extinktion durch Reduktion des DCP [600 nm].

Reagentien:

2,6-dichlorphenolindophenol-Na	Merck 3028 p.A.
NADH	Boehringer 15142 CNAB p.A.
Natriumnitrit (NaNO_2)	Merck 6549 p.A.
Natrium-DL-lactat purum	Fluka 71726

Drabkin Lösung:

Zusammensetzung

50.0 mg KCN
200.0 mg $K_3Fe(CN)_6$
140.0 mg KH_2PO_4
0.5 ml Sterox
ad 1000.0 ml mit Aqua dest.

TRAP-Puffer (Richterich 1965 S.146)

0.93 g EDTA (Dinatrium Salz, Dihydr.) MG=372,25

4,64 g Triäthanolamin Hydrochlor. MG=185,65

ad 500.0 ml Aqua dest.

pH=7,5 eingestellt mit 1.0 n Natronlauge NaOH

ACD-Lösung

13.2 g Natriumcitrat

4.4 g Zitronensäure

14.7 g Dextrose

ad 1000.0 ml Aqua dest.

Phosphatpuffer nach Sörensen

pH=7,5

0.06 M

NaCl-Phosphat-Puffer

pH=7,5

0.06 M Phosphatpuffer nach Sörensen

physiolog. NaCl Lösung 1:9

Hämoglobin Standard

Hycel 119 Merz u. Dade

zur Eichung der Hämoglobinmessung

nach Drabkin

Methode:

10.0 ml Vollblut wurde mit 3.0 ml ACD-Lösung gemischt. Nach Zentrifugation wurde das überstehende ACD-Plasma dekantiert und die Erythrocyten mit gleichen Volumina 1.25 Proz. NaNitrit Lösung und Phosphatpuffer pH=7,5 versetzt. Nach nochmaligem Zentrifugieren wurde der Überstand verworfen und das Erythrocytensediment 3 x mit NaCl-Phosphat-Puffer pH=7,5 gewaschen.

Der Test wurde in drei Modifikationen durchgeführt:

α Testansatz nach Scott (Scott 1960)

Hämolysatherstellung

Zu 2.0 ml Erythrocytensediment werden 5.0 ml NaCl-Phosphat-Puffer pH=7,5 und 5.0 ml NaNitrit 1.25 Proz. Lösung gegeben. Diese Mischung wird für 20 Minuten bei 37 C inkubiert. Anschließend wird das NaNitrit durch mehrmaliges (4x) Auswaschen mit NaCl-Phosphat-Puffer ausgewaschen. Die gereinigten Erythrocyten werden zu einer gleichen Menge NaCl-Phosphat-Puffer pH=7,5 gegeben.

Bestimmung der Hämoglobinkonzentration mit Drabkin-Reagenz. [s.u.]

3.25 mg Hämoglobin (Volumenberechnung nach Messung der Hämoglobinkonzentration) werden ad 2.8 ml mit Aqua dest. ergänzt.

Bestimmung der Hämoglobinkonzentration (oder Hämioglobinkonzentration) mit Drabkin Reagenz:

20 µl Erythrocyten werden in 5.0 ml Drabkinreagenz gegeben und gegen Aqua dest. bei 546 nm abgelesen.
Berechnung:

$$\frac{E \cdot 16114 \cdot 5.02}{11000 \cdot 0.02 \cdot 10} = 36,8 \times E \quad \text{gHb/100.0 ml}$$

TRAP-Puffer pH=7,5

NADH 3 mM 2.0 mg/ml

DCP 1.2 mM 3.5 mg Proz.

Testansatz: Messung bei 600 nm

0.15 ml TRAP-Puffer pH=7,5

0.05 ml DCP 1.2 mM

2.8 ml Hämolysat (=3.25 mg Hämoglobin)

Start mit 0.06 ml NADH 3 mM

Weiterhin wurden drei Leerwerte mitgeführt:

1. ohne Zusatz von DCP

2. ohne Zusatz von NADH

3. ohne Zusatz von Hämolysat

β Testansatz nach Tönz (Tönz 1968) -

Herstellung des Hämolysates

1.0 ml der gewaschenen Erythrocytensuspension werden mit 4.0 ml Aqua dest. hämolysiert und abzentrifugiert. Nach vorheriger Messung der Hämoglobinkonzentration der Erythrocytensuspension wird nun der klare Überstand mit Phosphatpuffer pH=7,5 - NaNO_2 1.25 Proz. = 3:1 auf eine Hämoglobinkonzentration von 0.2 g Proz. eingestellt.

Testansatz: Messung bei 366 nm Wellenlänge

Testmischung

0.05 ml NADH 9 mM

0.15 ml NaNO_2 1.25 Proz.

2.80 ml Phosphatpuffer pH=7,5

0.5 ml Hämolysat =1.0 mg Hämoglobin

0.1 ml Testmischung werden in eine Halbmikroküvette (d=1.0 cm) pipettiert und die Reaktion bis zum Stillstand gemessen. Dann wird die Reaktion mit 0.1 ml DCP 1.2 mM gestartet.

Es werden die gleichen Leerwerte wie unter α mitgeführt.

γ Testansatz eigene Modifikation der Methode nach Tönz

In dieser Modifikation wurde die Vorbereitung bis zum Testansatz vereinfacht. Im Gegensatz zu den Ansätzen α, β befindet sich im Testansatz noch das Stroma der hämolysierten Erythrocyten.

Die Erythrocyten wurden 3x mit NaCl-Phosphatpuffer pH=7,5 gewaschen, der Hämoglobingehalt mit Drabkin-Reagenz gemessen und eine aliquote Menge gewaschene Erythrocytensuspension mit 2.0 ml Aqua dest., 1.0 ml NaNO_2 1.25 Proz. und 1.0 ml Phosphatpuffer pH=7,5 versetzt, so daß eine Hämiglobinkonzentration von 0.2 g Proz. resultierte.

Dieses Hämolysat wurde in die Testvorschrift β eingesetzt.

Die Temperatur bei allen Messungen betrug 25°C.

3. Bestimmung der Hämiglobinreduktion nach Zugabe eines energiereichen Substrates.

Prinzip:

Wenn normale nitritbehandelte Erythrocyten (Hämoglobin in Hämiglobin umgewandelt) in Gegenwart von Glukose oder Laktat inkubiert werden, erfolgt in vitro eine Hämiglobinreduktion. Die Reaktion verläuft bis zu einem Wert von etwa 20 Proz. linear. Laktat eignet sich als Substrat für die Hämiglobinreduktion gut, da es durch die NADH abhängige Laktatdehydrogenase zu Pyruvat oxidiert wird. (Tönz 1968).

Testansatz

ACD-Blut wurde zentrifugiert. Der Überstand wurde dekan-
tiert und 2.0 ml der Erythrocyten in 2.0 ml NaCl-
Phosphat-Puffer pH= 7,5 suspendiert. Die Suspension
wurde mit 2.0 ml NaNO_2 (1.25 Proz.) versetzt und
für 20 Minuten bei 37°C in einem Wasserbad inkubiert.
Anschließend wurden die Erythrocyten, um das NaNO_2
vollständig zu entfernen, 10x mit NaCl-Phosphatpuffer
pH=7,5 gewaschen. Das gewaschene Erythrocytensediment

wurde zu gleichen Teilen in NaCl-Phosphatpuffer suspendiert. Die Hämiglobinkonzentration wurde gemessen und mit NaCl-Phosphatpuffer pH=7,5 auf eine Hämiglobinkonzentration von 6 g Proz. eingestellt.

Zu 2.0 ml dieser Suspension wurde 0.2 ml NaLaktat (0.5 M) gegeben. Die Hämiglobinkonzentration dieser Suspension wurde sofort und nach einer 4-stündigen Inkubation bei 37 C gemessen.

II. Ergebnisse

A Reaktionskinetik

1. einzelne Reaktionsschritte im Test bei optimalem pH (pH=7,5).

α Reaktion von DCP mit NaNO_2 (Wellenlänge 366 nm)
Zusatz von DCP zu einer NaNO_2 Lösung führte zu einer geringen Extinktionsabnahme in der 1. Minute. Diese Extinktionsabnahme kann jedoch vernachlässigt werden.

β Reaktion von NADH mit NaNO_2 (Wellenlänge 366 nm)
Nach NADH Zusatz erfolgte eine ganz geringe Extinktionsabnahme, die nach etwa 5 Min. zum Stillstand kam.

γ Reaktion von Hämoglobin mit NADH (Wellenlänge 366 nm)
Hierbei erkennt man eine geringe Abnahme der Extinktion, die nach etwa 6.0 Minuten zum Stillstand kommt. Dieser Leerwert (1) braucht man nicht vom Testwert subtrahieren, da die Reaktion des Testwertes erst bei Stillstand gestartet wird.

δ Reaktion von DCP mit NADH ohne Zusatz von NaNO_2 .
NADH wird von DCP oxidiert, wobei die konstante Geschwindigkeit etwa doppelt so groß ist wie die Reaktion zwischen NADH und NaNO_2 . Ein Stillstand war während einer 10 minütigen Messung nicht zu beobachten.
Dieser Leerwert (3) muß von dem Testwert subtrahiert werden.
Siehe Abbildung 1a

ε₁ Reaktion von Hämoglobin mit DCP mit Zusatz von NaNO_2 .
Es zeigt sich über der gesamten Meßzeit eine fortlaufende Extinktionsabnahme. Diese Extinktionsabnahme muß als Leerwert (2) vom Testwert subtrahiert werden.

ε₂ Reaktion von Hämoglobin Standard (Hycel) mit DCP (Wellenlänge 366 nm)
Nach einem geringen Anstieg der Extinktion erkennt man einen Extinktionsabfall, der nach etwa 5 Minuten

zum Stillstand kommt.

Siehe Abb. 1b (α_1)

Reaktion von Hämoglobin Standard (Hycel) mit DCP bei der Wellenlänge von 600 nm.

Es ist nur ein geringer Extinktionsabfall zu erkennen, der nach 5.0 Minuten zum Stillstand kommt.

Siehe Abb.1b (β_2)

Reaktion von Hämoglobin mit NADH (Wellenlänge 600 nm)

Die Extinktionsabnahme ist gering und über den Zeitraum konstant.

2.Einfluss des pH Wertes:

A Einfluß des pH Wertes auf die Kinetik der enzymatischen und nichtenzymatischen NADH Oxidation.

Die enzymatische NADH Oxidation mit DCP als Wasserstoffakzeptor steigt mit fallendem pH.(pH=8.0-6.0). Der Effekt ist abhängig von der NADH Konzentration im Test.Je höher die NADH Konzentration,desto ausgeprägter ist der pH Effekt auf die enzymatische NADH Oxidation.Die nichtenzymatische NADH Oxidation ohne Zusatz von Hämolysat und damit auch ohne Zusatz von Hämoglobin im Test steigt bei fallendem pH deutlich stärker als die enzymatische NADH Oxidation.

Siehe Abbildung 2

B Einfluß des pH Wertes auf die Kinetik der enzymatischen und nichtenzymatischen Farbstoffreduktion.

Die pH Abhängigkeit der enzymatischen Farbstoffreduktion verhält sich ähnlich der NADH Oxidation. Auch hier ist der pH Effekt auf die Farbstoffreduktion ohne Enzym wesentlich ausgeprägter als in Gegenwart von Enzym.Um auszuschließen,daß der Hämoglobingehalt des Hämolysates für diesen Effekt

verantwortlich ist, wurden in diesem Ansatz eine nitrierte Hämoglobin Standard Lösung mit gleichem Hämiglobingehalt zugesetzt.

Siehe Abbildung 3

Die Kinetik der NADH unabhängigen Farbstoffreduktion mit Hämoglobin ist bei dem pH Wert von pH=6.0 deutlich schneller als bei dem pH Wert pH=9.0 und kommt auch später erst zum Stillstand.

Siehe Abbildung 4

C Messung der NADH abhängigen Farbstoffreduktion in Gegenwart von Hämoglobin bei steigender NADH Konzentration.

Mißt man die NADH abhängige Farbstoffreduktion in Gegenwart von Hämoglobin als weiteren Akzeptor bei steigender NADH Konzentration, so wird die maximale Reaktionsgeschwindigkeit bei pH=7.0 bei wesentlich geringer NADH Konzentration erreicht, als bei dem pH Wert pH=7.5. Bei pH=7.5 wurde $V_{\max}$ bei 9.0×10^{-5} mMol NADH im Test noch nicht erreicht.

Siehe Abbildung 5

Die Ergebnisse können auch dadurch dargestellt werden, indem man die reziproken Werte nach Lineweaver Burk aufträgt. Die resultierende Gerade verläuft bei pH=7.5 steiler als bei pH=7.0. Dies bedeutet, daß die Reaktionskonstante K_M bei pH=7.0 kleiner ist, als bei pH=7.5.

Siehe Abbildung 6

3 Variation der NADH Konzentration

Die Wirkung der NADH Konzentration auf die Reaktionsgeschwindigkeit wurde bei 366 nm und der Wellenlänge 600 nm gemessen. Bei 366 nm steigt die Reaktionsgeschwindigkeit mit steigender NADH Konzentration bis zu einem Maximum, ebenso ist der Kurvenverlauf, wenn bei 600 nm gemessen wird. Betrachtet man die K_M als Konzentration, bei der die halbe maximale Reaktionsgeschwindigkeit erreicht wird, so erhält man zwei Werte für K_M , nach Auftragen nach Lineweaver-Burk, bei 366 nm und bei 600 nm, die nicht übereinstimmen.

Die Reaktionsgeschwindigkeit der nichtenzymatischen NADH Oxidation bei 366 nm ohne Hämoglobin in Abhängigkeit von der NADH Konzentration steigt dagegen annähernd linear und erreicht auch bei hohen NADH Konzentrationen kein Maximum. Zieht man von der enzymatischen NADH Oxidation den Wert der nichtenzymatischen Oxidation als Leerwert ab, so erhält man eine völlig andere Kinetik der Substratabhängigkeit. Die maximale Reaktionsgeschwindigkeit wird bei wesentlich niedriger NADH Konzentration erreicht. Bei weiterer Erhöhung der NADH Konzentration nimmt die Reaktionsgeschwindigkeit wieder ab. Es ist daher zu diskutieren, ob diese Korrektur zulässig ist. Dies würde voraussetzen, daß die nichtenzymatische Reaktion auch in Gegenwart des Enzyms als Reaktion abläuft. Dies ist aber nicht zu beweisen, da die Gegenwart von weiteren Wasserstoffakzeptoren das Gleichgewicht zwischen NADH und DCP verändern.

Siehe Abbildung 7 und 8

4 Variation der DCP Konzentration

Bei steigender DCP Konzentration im Test steigt die Reaktionsgeschwindigkeit annähernd linear, sowohl bei 366 nm und bei 600 nm unter der Voraussetzung einer ausreichend hohen NADH Konzentration. Die Erwartung, daß diese Abhängigkeit der Michaelis-Menten Kinetik erfolgt, konnte demnach nicht bestätigt werden. Scott (Scott 1962) fand an hochgereinigtem Enzym eine Michaelis-Menten Kinetik für beide Reaktionen und konnte K_M Werte für den Umsatz des NADH und des DCP ermitteln. Bei der Verwendung eines Hämolyrates dagegen kam Scott zu Ergebnissen, die mit den oben beschriebenen übereinstimmen.

Siehe Abbildung 9

B klinische Ergebnisse

Die Ergebnisse der Hämoglobinreduktaseaktivitäten bei drei Kollektiven [Gesunde, Patienten mit Darmerkrankungen und Patienten mit Dermatitis herpetiformis] sind in Tabelle 1 zusammengefasst.

Der Vergleich der Mittelwerte der zwei Kollektive von Patienten, die mit Azulfidine^R und DADPS^R behandelt wurden, zeigt, daß im Kollektiv keine signifikanten Differenzen zwischen behandelten und unbehandelten Personen besteht.

Bei fünf freiwilligen Versuchspersonen, bestehend aus drei Gesunden und zwei Colitis ulcerosa Patienten, wurde die Hämoglobinreduktion und die Hämoglobinbildung ohne und unter Therapie mit Azulfidine^R gemessen.

Siehe Tabelle 2

Die Tabelle 2 zeigt, daß die Hämoglobinreduktion während der Medikation mit Azulfidine geringer ist, als ohne Medikation. Der Unterschied der Hämoglobinreduktion vor und während der Medikation ist signifikant.

Ebenfalls erkennt man, daß der Hämoglobingehalt unter Medikation höher ist, als ohne Azulfidine^R.

Auch hier konnte eine Signifikanz der Unterschiede festgestellt werden.

Als Ergebnis kann gesagt werden, daß im gesamten Kollektiv, durch die biologische Steuerung bedingt, keine signifikanten Unterschiede gegenüber Gesunde gefunden werden konnte.

Im direkten Vergleich war der Unterschied jedoch signifikant, sodaß eine Aktivitätsminderung der Hämoglobinreduktase und erhöhte Hämoglobinbildung durch Azulfidine möglich ist.

III Diskussion

Bei hereditären Hämoglobinämien wurde ein vollständiges Fehlen eines Enzyms in den Erythrocyten gefunden. (Gärtner)(Moser)(Ross) Dieses Enzym wird von allen Autoren als Diphosphopyridindinucléotiddiaphorase bezeichnet. (Huennekens), und gehört zu den Flavinenzymen. Die Eigenschaften dieses Enzyms: in menschlichen Erythrocyten wurden von Scott und Mc Graw 1962 beschrieben. Die Autoren fanden, daß unter den üblichen Testbedingungen zunächst eine rasche Reduktion des Enzyms durch NADH erfolgt. In der zweiten Hälfte der Reaktion kommt es zu einer Reduktion eines Akzeptors durch die entstandene Menge reduzierten Enzyms. Das Enzym reduziert 2,6-dichlorphenolindophenol, Cytochrom c und Hämoglobin. Andere Autoren bezeichnen die Hämoglobinreduktase auch als Cytochrom b_5 -Reduktase, da zwischen dem Enzym und dem Hämoglobin noch Cytochrom b_5 eingeschaltet ist. (Hultquist)

Viele der Flavinenzyme wirken direkt auf Substrate, andere dienen in der Atmungskette zur Oxidation der reduzierten Pyridin-Coenzyme. Für diese Enzyme, die meist FMN als prosthetische Gruppe enthalten, ist der Name NADH-Cytochrom c-Reduktase gebräuchlich (Karlson).

Ziel der eigenen Untersuchungen war nachzuweisen, ob das Enzym auch bei exogener Hämoglobinämie vermindert ist, vorallem bei der häufigen Hämoglobinbildung bei der Sulfonamidbehandlung.

Es gibt mehrere Möglichkeiten zur Messung der Enzymaktivität:

α die Messung der NADH Oxidation

β die Messung der Reduktion des Akzeptors

- die Messung des Verschwinden des Hämiglobins bei Zusatz von Glukose oder Laktat.
- Verschwinden der Extinktion des DCP

Da die Kinetik des Erythrocytenenzym vorallem am hochgereinigtem Enzym geprüft wurde (Scott 1961), ergab sich die Notwendigkeit, die Kinetik des optischen Testes im Hämolysat zu prüfen. Besonders mußten Substratoptimum, pH Abhängigkeit und Störreaktionen, Fremdaktivitäten und nichtenzymatische Prozesse untersucht werden. Es zeigte sich, daß an der Gesamtreaktion unter den Testbedingungen in vitro in erheblichem Maß nicht-enzymatische Prozesse beteiligt sind und daß außer der direkt an der Reaktion beteiligten Partner NADH und DCP, auch Hämoglobin mit NADH reagiert. Es hat sich weiter gezeigt, daß die nichtenzymatische Reaktion mit fallendem pH stärker beschleunigt wird als die enzymatische. Die Konsequenz dieser Ergebnisse ist, daß im Test auf eine genaue Einhaltung des pH Wertes geachtet werden muß. Auf keinem Fall dürfen pH Werte und Testkonzentrationen gewählt werden ($\text{pH} < 7.5$), bei dem die nicht-enzymatischen Reaktionen die enzymatischen an Geschwindigkeit übertreffen, da dann nie Leerwertkorrekturen mehr möglich sind.

Wurde die Enzymaktivität bei steigender NADH- und DCP-Konzentration im Hämolysat gemessen, so zeigte sich, daß die Enzymaktivität bei steigender NADH-Konzentration ähnlich einer Michaelis Menten Kinetik steigt, während sie der DCP-Konzentration fast völlig proportional ist. Damit unterscheidet sich das Hämolysatenzym von dem hochgereinigtem Enzympräparat von Scott, da Scott für dieses mit beiden Substraten eine Michaelis Menten Kinetik fand. Aus diesem Grund können die Testbedingungen, die Scott an hochgereinigten Präparaten fand, nicht ohne weiteres auf die Bedingungen im Hämolysat übertragen werden.

Tönz (1968) konnte zeigen, daß im Testansatz mit NADH als Substrat bzw. als Elektronendonator und DCP als Elektronenakzeptor die Elektronenübertragung nicht ausschließlich durch die Diaphorase I (Hämoglobinreduktase) erfolgt, sondern daß auch die NADPH-abhängige Diaphorase II in die Reaktion eingreift. Während die Diaphorase I eine hohe Spezifität für NADH aufweist, kann die Diaphorase II

sowohl mit NADPH als auch mit NADH reagieren. Beide Diaphorasen können Elektronen auf DCP übertragen, sodaß im gewählten Reaktionsansatz neben der NADH-abhängigen eigentlichen Hämoglobinreduktase auch zum Teil die Aktivität der relativ unspezifischen NADPH-abhängigen Diaphorase II mitbestimmt wird.

Die wahre Hämoglobinreduktaseaktivität liegt damit niedriger als unsere Meßwerte. Normalerweise spielt die Diaphorase II für die Hämoglobinreduktion nur eine untergeordnete Rolle (weniger als 10 % der Gesamthämoglobinreduktaseaktivität) (Tönz 1968), da sie die Elektronen nicht direkt auf Hämoglobin überträgt, sondern einen Redoxfarbstoff wie z.B. Methylenblau oder Toluidinblau als Vermittler benötigt.

Der kinetische Test im Hämolysat wurde bei der Wellenlänge 366 nm [NADH Oxidation] aus folgendem Grund durchgeführt:

Die NADH Oxidation verläuft nicht stöchiometrisch parallel der Farbstoffreduktion, da, wie bereits beschrieben, einmal die Kinetik der NADH Oxidation eine andere ist als die Farbstoffreduktion und zum anderen die Extinktionsabnahme bei 600 nm durch mehrere Reaktionen hervorgerufen wird; insbesondere wird eine Störreaktion durch das Hämoglobin gemessen. Das Maximum der Hämoglobinextinktionsbande liegt bei 630 nm.

Bei 366 nm ergibt sich allerdings auch eine Fehlerquelle: die Umwandlung von Oxy-Hämoglobin in Hämoglobin ergibt hier eine erhebliche Extinktionsdifferenz. Diese Differenz kann durch Zusatz von NaNO_2 weitgehend vermieden werden, welches das gebildete Hämoglobin sofort wieder in Hämoglobin umwandelt (Tönz 1968). Eine geringe Reaktion wird in Leerwerten berücksichtigt. Im Gegensatz zu Tönz berücksichtigten wir drei Leerwerte, sodaß unsere Werte niedriger liegen als die Werte von Tönz (1968).

[siehe auch Tabelle 1]

Bei dem untersuchten Patientenkollektiv [Hämoglobinkonzentration >1.2 %] mit Colitis ulcerosa zeigten

sich keine signifikanten Unterschiede gegenüber dem Normalkollektiv.

Da alle Patienten mit Colitis ulcerosa mit Azulfidine^R behandelt wurden, scheint dieser Befund zunächst eine Beeinflussung des Enzyms durch Sulfonamide auszuschließen. Dies würde bedeuten, daß die bei diesen Patienten beobachtete Hämoglobinbildung nicht durch eine Hemmung des Enzyms hervorgerufen wird. Wurde die Hämoglobinreduktion im Verlauf der Behandlung und im Auslassversuch bei einzelnen Patienten und einigen Versuchspersonen verglichen, so zeigte sich eine signifikante Abnahme der Hämoglobinreduktion unter dem Einfluß von Azulfidine^R. Ebenso fand sich bei DADPS^R behandelten Patienten eine signifikante negative Korrelation zwischen Hämoglobinkonzentration und Hämoglobinreduktion.

Worathumrong (1972) konnte bei sehr hohen Konzentrationen von Salicylsäure zeigen, daß auch eine direkte Beeinflussung der Hämoglobinreduktase in vitro möglich ist. Diese Konzentrationen liegen jedoch in einem Bereich, die nur bei schweren Vergiftungen möglich sind und niemals bei der Therapie mit Medikamenten erreicht werden können.

Es konnte somit angenommen werden, daß eine Hemmung des Enzyms als Ursache einer ungenügenden Hämoglobinreduktion unter Sulfonamid- und Sulfongaben nur bei hoher Dosierung manifest wird und daher im Gesamtkollektiv nicht nachweisbar ist. Ebenso könnte eine Hemmung des Enzyms nur bei hohen Hämoglobinkonzentrationen nachweisbar sein. Deswegen wurde geprüft, ob eine Korrelation zwischen der Aktivität der Hämoglobinreduktase und der Dosis von Azulfidine^R und DADPS^R einerseits und zwischen Enzymaktivität und Hämoglobingehalt der Erythrocyten andererseits besteht.

Es fanden sich keine signifikanten Korrelationen zwischen Enzymaktivität im kinetischen Test nach Tönz und Hämoglobin unter Azulfidinetherapie, ebenso nicht zwischen Enzymaktivität und Sulfonamiddosis.

Siehe Abbildung 10 und 11

Dagegen bestanden signifikante negative Korrelationen zwischen Hämoglobinreduktion und Hämiglobingehalt der Erythrocyten unter DADPS^R Behandlung, dagegen nicht unter Azulfidine^R Behandlung.

Siehe Abbildung 12

IV Graphische Darstellung der Ergebnisse und Tabellen.

Kollektiv		Hämiglobinreduktase μMol / Min. / g Hb	Hämiglobinreduktion in Proz.in 4 Std.		
Normalpers.	$\bar{M}$	A 1.87	B 1.74	C 29.25	Signifi- kanz zum Normalkol.
	$\pm 2 S$	1.02	1.10	12.18	
	n	14	12	21	
Col.ulc. behandelt Azulfidine ^R	$\bar{M}$	A 1.74	B 1.52	C 25.90	A 0.70 > p > 0.60 B 0.50 > p > 0.40 C 0.25 > p > 0.20
	$\pm 2 S$	1.18	1.44	15.00	
	n	9	7	43	
Derm.herp. behandelt DADPS ^R	$\bar{M}$	A 1.35	B 1.48	C 21.30	A 0.20 > p > 0.10 B 0.40 > p > 0.30 C 0.10 > p > 0.05
	$\pm 2 S$	2.20	1.18	22.80	
	n	6	8	7	

Tabelle 1

Hämiglobinreduktaseaktivität und Hämiglobinreduktion
in verschiedenen Kollektiven und die Signifikanz zum
Normalkollektiv.

A Methode nach Tönz (siehe Methodik) (Tönz 1968)

B Eigene Modifikation der Methode nach Tönz.

angegeben wurde der korrigierte Hauptwert [Hauptwert
-Leerwert 1 , -Leerwert 2 , -Leerwert 3]

unkorrigierter Hauptwert bei Normalpersonen Methode A:
=3.64 $\pm$ 1.36 [Tönz gibt an: 2.9 $\pm$ 1.2] (Tönz 1968)
[μMol/min./g Hb =I.U.]

C Methode nach Tönz (siehe Methodik) (Tönz 1968)

Azulfidine-Dosis g/die	J.Sch.	Dr.M.	Dr.Sch.	G.Sch.	M.J.
	Normalpersonen			Patienten	
	Hämiglobinkonzentration				
o.o	0.33 0.76	0.35 0.22	0.18	0.41 0.28	0.50 0.15
3.0	0.70 1.10 0.75	0.45 0.74 0.95	1.60 1.80	1.75 2.00	0.60 2.00 3.70
6.0	1.20 1.18	1.00 0.90			
o.o	0.21 0.42	0.38	0.65	1.15 0.59	0.67
	Hämoglobinreduktion (% in 4 Std.)				
o.o	32.50	34.00	27.00		20.00
3.0	19.00	18.75 20.75	22.00 28.00	30.25 31.75	
6.0	22.00 23.50	17.75 23.50			
o.o	38.00			36.75	36.00

Tabelle 2

Bei 5 freiwilligen Personen, bestehend aus drei Gesunden und zwei Colitis ulcerosa Patienten, wurde die Hämiglobinreduktion und die Hämiglobinbildung ohne und mit Therapie von Azulfidine^R gemessen.

Hämiglobinkonz. ohne - mit Therapie $p > 0.001$
Hämoglobinred. ohne - mit Therapie $0.02 > p > 0.010$

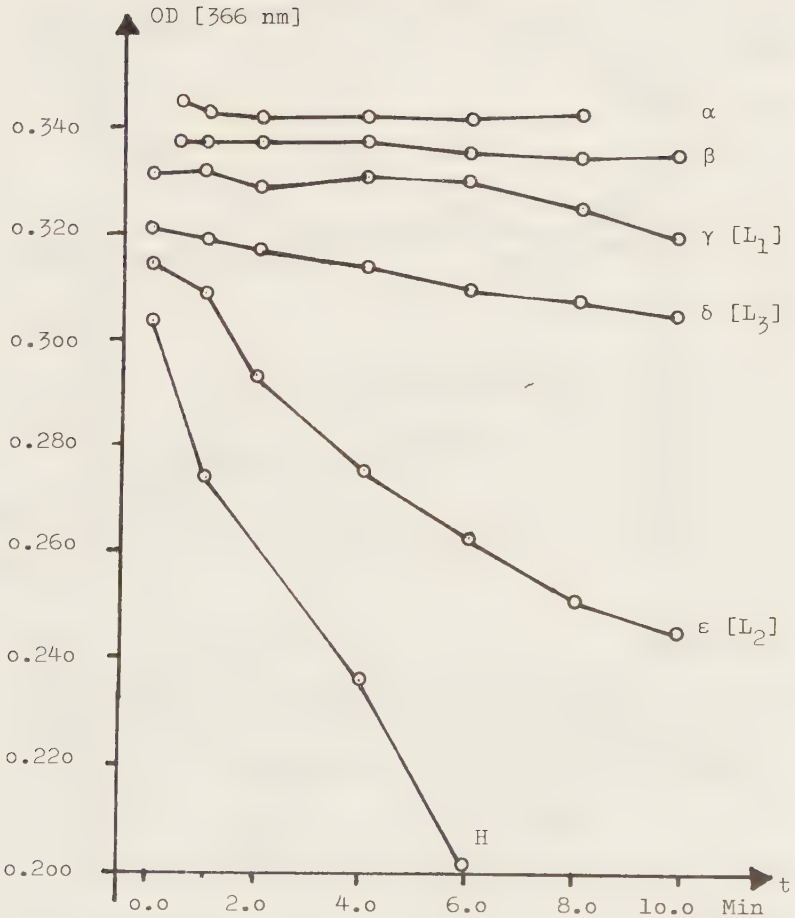


Abbildung 1a

einzelne Reaktionsschritte im Test bei pH=7,5

α 2 mg NaNO₂, $2,4 \times 10^{-4}$ mMol DCP

β 2 mg NaNO₂, $1,5 \times 10^{-5}$ mMol NADH

γ $1,5 \times 10^{-5}$ mMol NADH, 1.0 mg Hämiglobin [L₁]

δ $1,5 \times 10^{-5}$ mMol NADH, $1,2 \times 10^{-4}$ mMol DCP [L₃]

ε $1,2 \times 10^{-4}$ mMol DCP, 1.0 mg Hämiglobin [L₂]

H $1,2 \times 10^{-4}$ mMol DCP, 1.0 mg Hämiglobin, $1,5 \times 10^{-5}$ mMol NADH

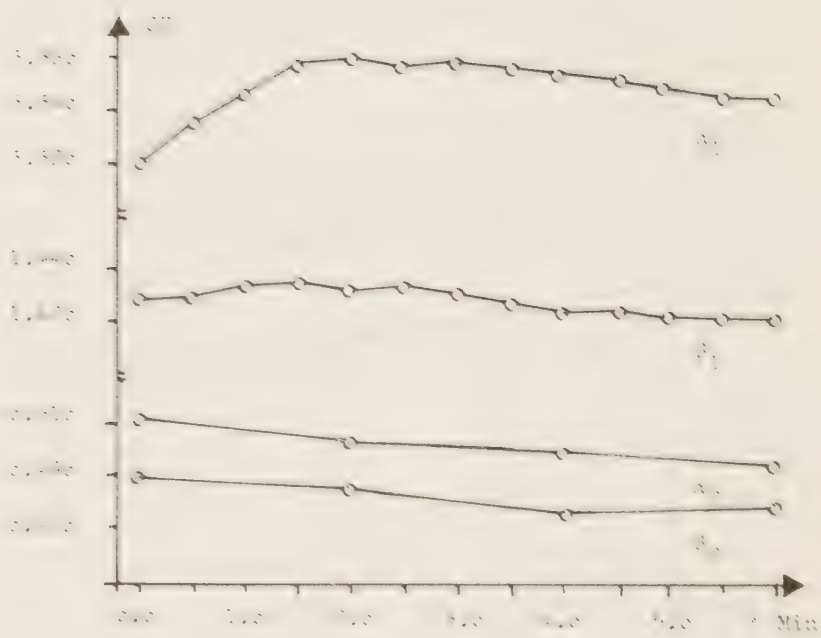


Abbildung 13

minimale Reaktionszeit bis Hämoglobinstandard in Test-Set ermittelt ist (pH 7,4)

A₁ (300 ml) 0,25 mg Hämoglobin Standard,
 $1,2 \times 10^{-4}$ mol/l pH

A₂ (300 ml) 0,25 mg Hämoglobin Standard,
 $7,5 \times 10^{-4}$ mol/l pH

TRAP-2000 Puffer auf 7,4

A₃ (300 ml) 1,25 mg Hämoglobin Standard,
 $1,5 \times 10^{-4}$ mol/l pH

A₄ (300 ml) 1,25 mg Hämoglobin Standard,
 $2,5 \times 10^{-4}$ mol/l pH

TRAP-2000 Puffer auf 7,4

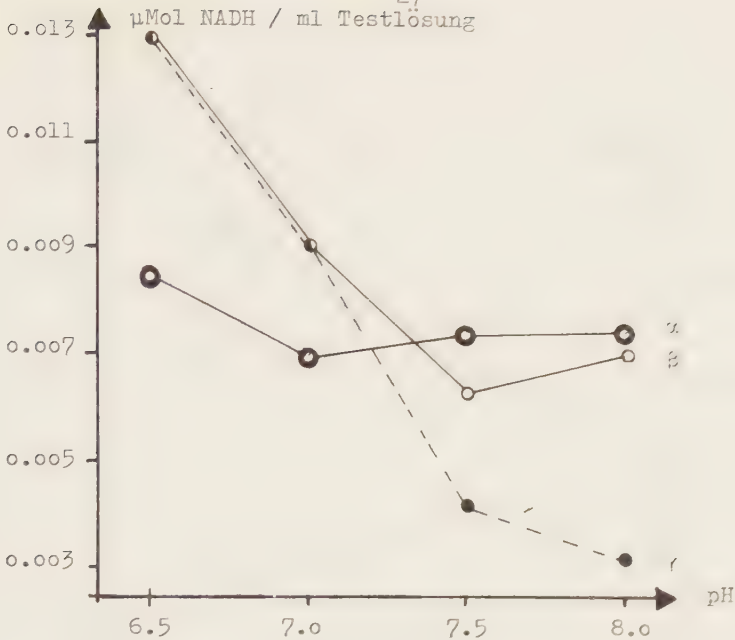


Abbildung 2

pH Wirkung auf die Kinetik der enzymatischen und nicht-enzymatischen NADH Oxidation (Wellenlänge 340 nm ,

Enzymatische Oxidation von NADH:

α 9×10^{-5} mMol NADH , 1.2×10^{-4} mMol DCP , 1.0 mg Hämoglobin

β 18×10^{-5} mMol NADH , 1.2×10^{-4} mMol DCP , 1.0 mg Hämoglobin

Nichtenzymatische Oxidation von NADH

γ 18×10^{-5} mMol NADH , 1.2×10^{-4} mMol DCP [L₂]

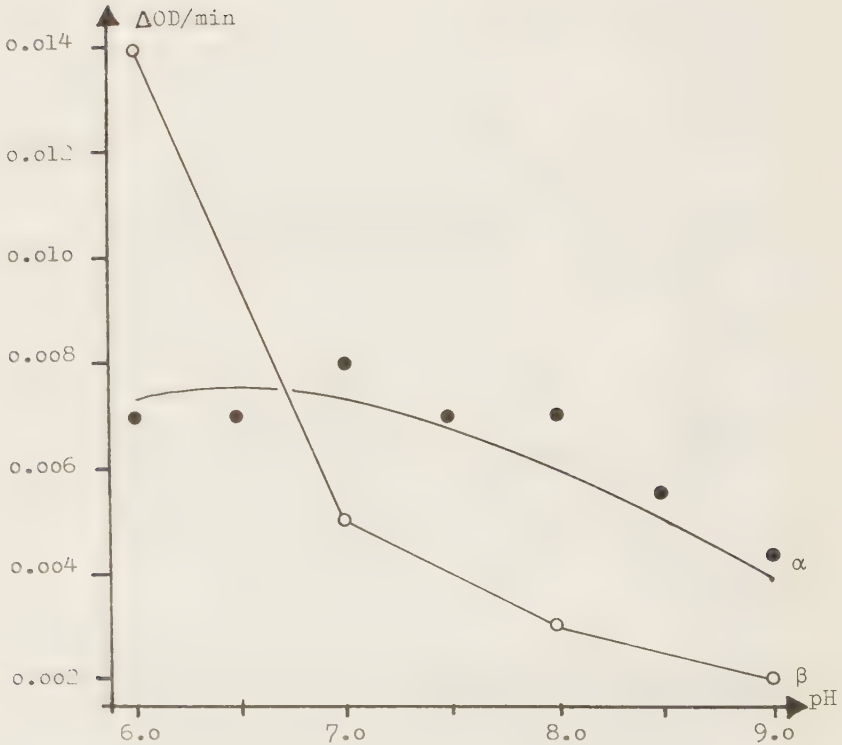


Abbildung 3

enzymatische und nichtenzymatische Farbstoffreduktion
bei verschiedenen pH Werten (Wellenlänge 600 nm)

α enzymatische DCP Reduktion

1.8×10^{-5} mMol NADH , 0.6×10^{-4} mMol DCP , 3.25 mg Hämi-
globin

β nichtenzymatische DCP Reduktion mit Zusatz von Hämi-
globin Standard (siehe Methodik)

1.8×10^{-5} mMol NADH , 0.6×10^{-4} mMol DCP , 3.25 mg Hämi-
globin Standard

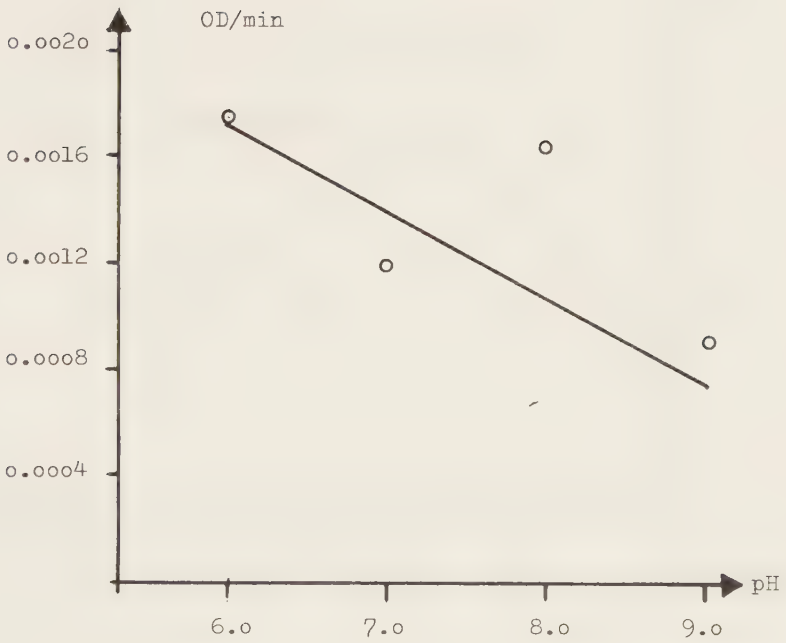


Abbildung 4

Farbstoffreduktion (DCP) mit Hämoglobin Standard ohne
Zusatz von NADH [Wellenlänge 600 nm]
(0.6×10^{-4} mMol DCP , 3.25 mg Hämoglobin Standard)

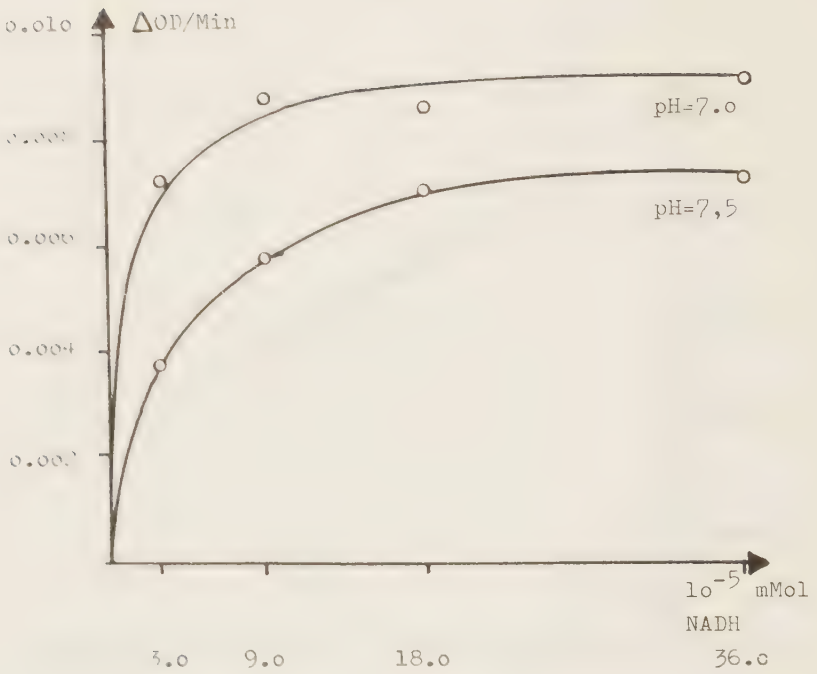


Abbildung 5

Abhängigkeit der Farbstoffreduktion von der NADH Konzentration bei zwei verschiedenen pH Werten (pH=7.0 , pH=7.5) [Wellenlänge 600 nm]
 (0.6×10^{-4} mMol DCP , 3.25 mg Hämoglobin)

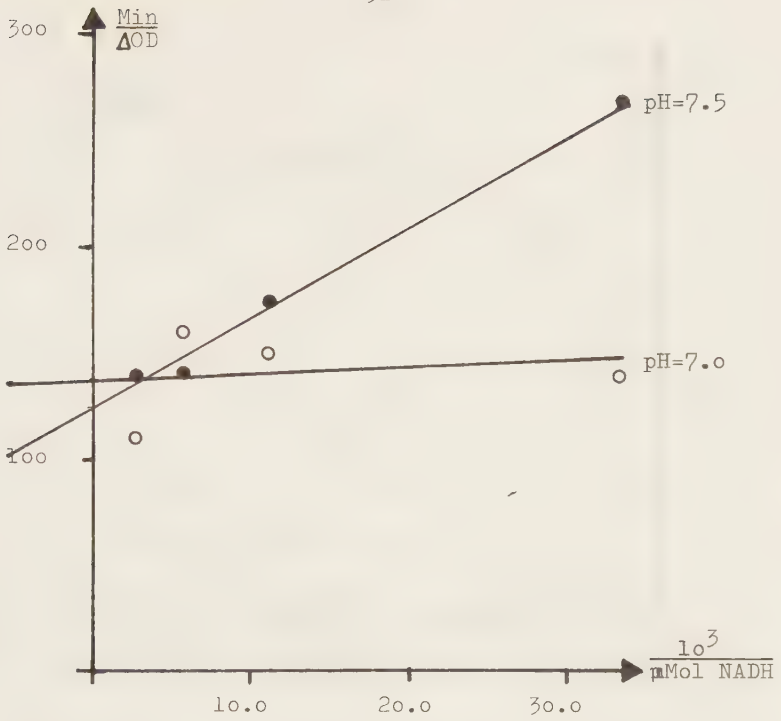


Abbildung 6

Reziproke Auftragung der Werte der Abbildung 5 nach Lineweaver Burk.

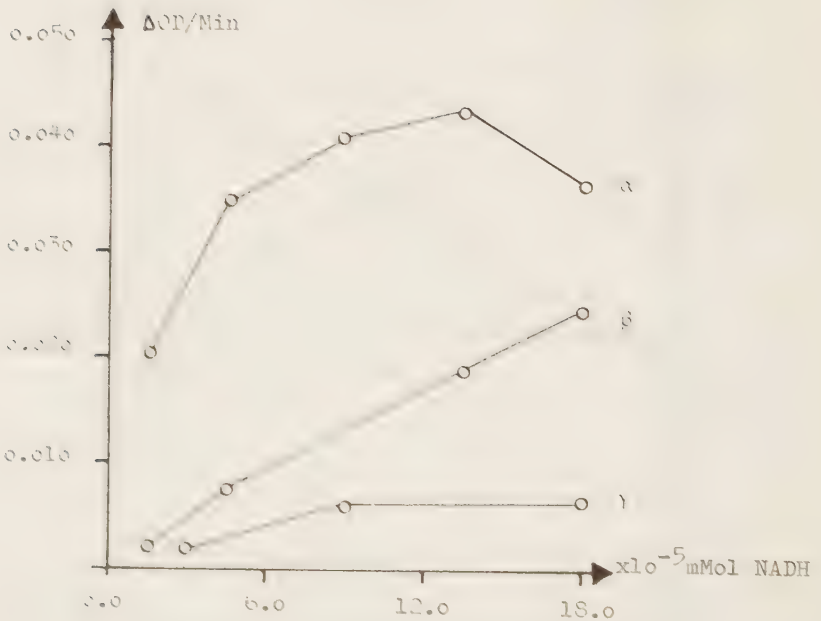


Abbildung 7

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der NADH Konzentration

α enzymatische Reaktion [Wellenlänge 366 nm]

$1.2 \times 10^{-4} \text{ mMol DCP}$, 1.0 mg Hämoglobin

β nichtenzymatische Reaktion [Wellenlänge 366 nm]

$1.2 \times 10^{-4} \text{ mMol DCP}$, kein Hämolyzatszusatz

γ enzymatische Reaktion [Wellenlänge 600 nm]

$0.6 \times 10^{-4} \text{ mMol DCP}$, 3.25 mg Hämoglobin

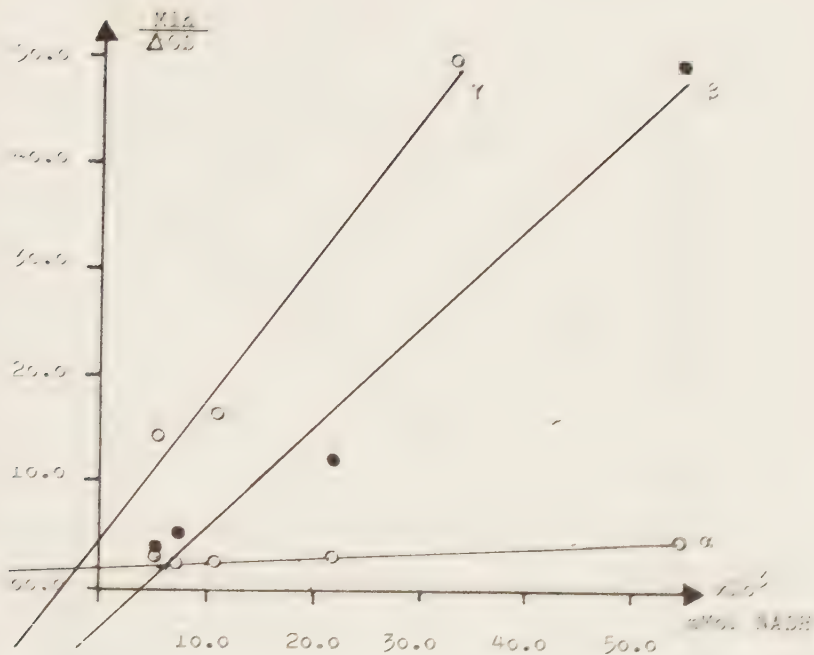


Abbildung 2

Reziprokes auftragen der Werte der Abbildung 7 nach Lineweaver Burk.

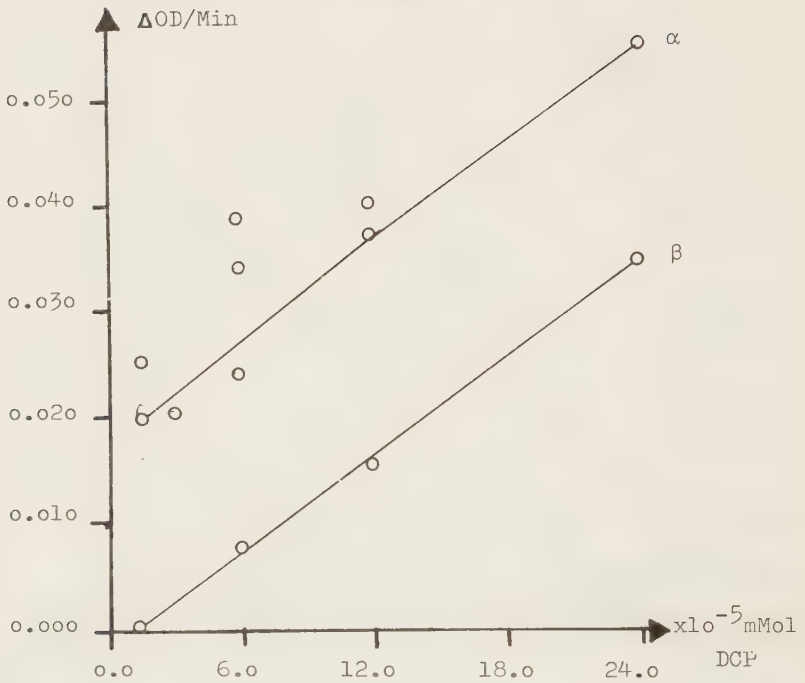


Abbildung 9

Abhängigkeit der Reaktionsgeschwindigkeit von der DCP Konzentration

Enzymatische Reaktion:

α $18.0 \times 10^{-5} \text{ mMol NADH}$, $1.0 \text{ mg Hämiglobin}$,
Wellenlänge 366 nm

β $36.0 \times 10^{-5} \text{ mMol NADH}$, $3.25 \text{ mg Hämiglobin}$,
Wellenlänge 600 nm

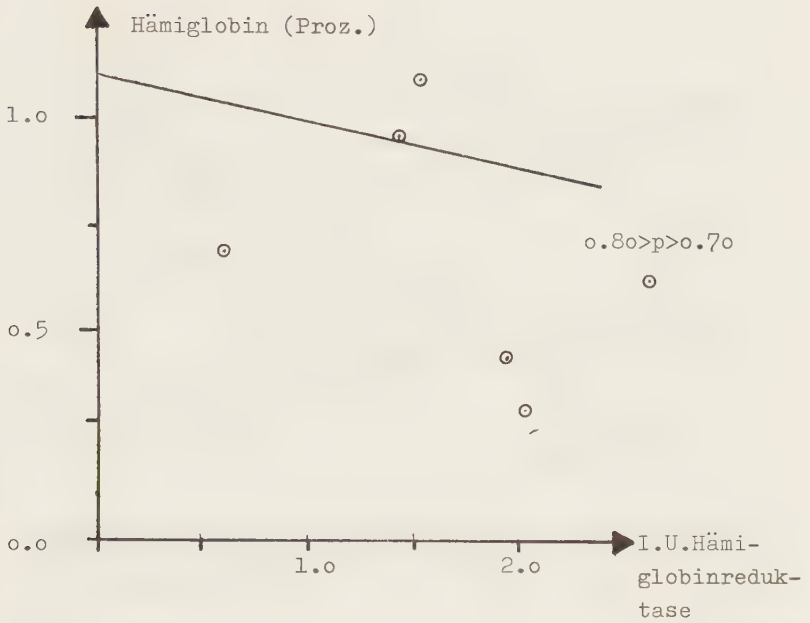


Abbildung 10

Korrelation zwischen Enzymaktivität im kinetischen Test nach Tönz und der Hämoglobinkonzentration unter Azulfidine^R Therapie

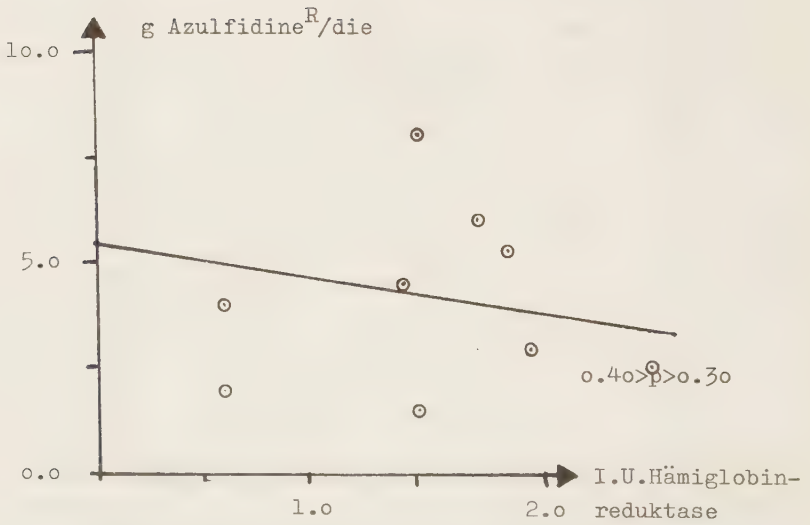


Abbildung 11

Korrelation zwischen Enzymaktivität im kinetischen Test nach Tönz und der Azulfidine^R-Dosis

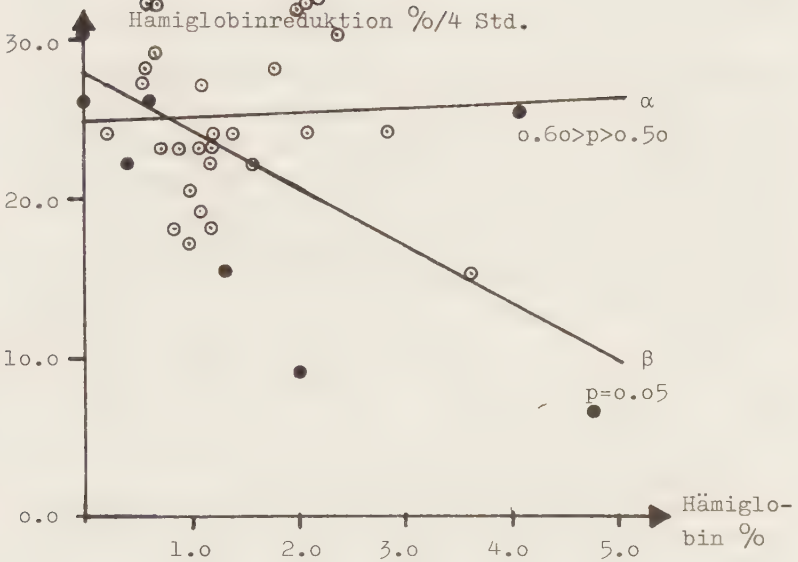


Abbildung 12

Korrelation zwischen Hämiglobinreduktion und Hämiglobinkonzentration

α unter Azulfidine^R-Behandlung

β unter DADPS^R -Behandlung

Teil 2

Einleitung

Seit der Einführung der Antibiotika ist die Behandlung mit Sulfonamiden in den Hintergrund getreten. Die meisten noch im Handel befindlichen Sulfonamide z.B. Azulfidine^R sind schwer resorbierbar und werden zur Behandlung von Darmerkrankungen verwendet. Ein zur Leprabehandlung (Shepard) in außereuropäischen Ländern angewendetes Sulfon DADPS^R (4,4'-diaminodiphenylsulfon) wird in Europa zur Behandlung der Dermatitis herpetiformis verwendet. (Morgan) In einer klinischen Untersuchungsreihe wurden diese beiden Medikamente auf ihre Hämoglobinbildung und andere Nebenwirkungen untersucht.

Hämoglobinbildung durch Sulfonamide:

Im Körper können aus aromatischen Amino- und Nitroverbindungen die entsprechenden Arylhydroxylamine in der Leber gebildet werden (Uehleke).

Bei den Sulfonamiden als größte Gruppe therapeutisch benutzter aromatischer Amine können als Nebenwirkungen Hämoglobinbildung (Bodansky) (Friederiszick) (Sandner), Heinz Körper, Hämolyse (Horschler) (Moser) (Sandner), Allergien (Schwarz) und Polyneuropathien (Krücke) auftreten, die typisch für Arylhydroxylamine sind.

Thauer (1965) verglich einige Sulfonamide in Bezug auf Hämoglobinbildung in vitro und stellte fest, daß Sulfa-pyridin und 4,4'-Diaminodiphenylsulfon starke Hämoglobinbildner sind.

Das Sulfonamid Salizylazosulfapyridin (Azulfidine^R) wurde 1941 von Svartz für die Therapie der Colitis ulcerosa eingeführt. (Svartz 1941). Es hat seither in der Behandlung dieser chronischen Dickdarmerkrankung eine weite Verbreitung gefunden. Während mit allgemeinen Nebenwirkungen wie Übelkeit, Völlegefühl im Oberbauch, gelegentliches Erbrechen oder Kopfschmerzen bei 15-20 % der behandelten

Patienten zu rechnen ist (Watkinson), treten schwerwiegende Komplikationen wie Agranulocytose und hämolytische Anämie nur selten auf. Das spontane Auftreten von Heinz'schen Innenkörpern ohne klinisch relevante Hämolyse wurde bei 8 % der Patienten während der Therapie mit Azulfidine^R beobachtet (Böttiger).

Über Hämoglobinbildung wurde bisher nur vereinzelt, meist im Zusammenhang mit hämolytischer Anämie bzw. Heinz-Körper-Anämie berichtet (Spriggs)(Gardner)(Roth), obwohl Svartz (1942) an diese Komplikation gedacht hatte. Sulfapyridin, das im Organismus aus Azulfidine^R freigesetzt wird (Hanngren), ist als potenter Hämoglobinbildner bekannt (Thauer).

Der normale Hämoglobinspiegel im Blut: ,

Der normale Hämoglobinspiegel im Blut beträgt etwa 0.5-1.0 % des gesamten Blutfarbstoffes (Heubner 1947). Eigene Messungen ergaben einen Wert von 0.45 ± 0.31 % $[M \pm S]$, sodaß wir den Normalwert ≤ 1.2 % setzten (obere 2 σ Grenze). Von einer Hämoglobinämie spricht man, wenn der normale Hämoglobinspiegel merklich überschritten ist. Klinisch beobachtet man eine Cyanose erst, wenn mehr als 10.0 % des gesamten Blutfarbstoffes Hämoglobin ist. Diese Cyanose ist grau-blau. Bemerkenswert ist der Kontrast zwischen deutlicher Cyanose und fehlenden subjektiven Beschwerden, die erst bei einer Hämoglobinkonzentration von 30.0-40.0 % auftreten.

Die Oxidation des Hämoglobins zu Hämoglobin in menschlichen Erythrocyten wird durch einen enzymatischen Reduktionsmechanismus verhindert (Warburg)(Wendel)(Gibson). Ohne Enzym würde sich der Blutfarbstoff im Laufe einiger Tage zu Hämoglobin oxidieren (Eder)(Jandl). Bei etwa 50.0 % Hämoglobin wird ein Gleichgewicht mit Redoxsubstanzen erreicht (Finch).

Die Hämoglobinreduktion hängt von der Anlieferung von NADH ab, das in den Erythrocyten vorwiegend im Ablauf der Glykolyse beim Übergang von Glyceraldehyd-3-P auf 1,3-Diphosphoglycerat unter der Wirkung von Glyceraldehyd-3-P-Dehydrogenase entsteht. Eine andere Möglichkeit der NADH Anlieferung ist die Dehydrierung von Laktat.

Die weitere Elektronenübertragung von NADH auf das Hämoglobin erfolgt durch ein gelbes Enzym, die Hämoglobinreduktase oder sogenannte Diaphorase (Scott 1965), wobei nach neueren Befunden zwischen diesem Enzym und dem Hämoglobin noch Cytochrom b_5 eingeschaltet ist. (Hultquist)
Siehe Abbildung 1

Ursachen der Hämoglobinämien (Betke 1972)

1. Der reduzierende Enzymmechanismus der Erythrocyten wird überspielt, indem eine toxische Substanz rascher Hämoglobin erzeugt als reduziert werden kann. Dies ist die große Gruppe der toxischen Hämoglobinämien auf Grund einer Einwirkung gewisser Chemikalien oder Medikamente.

α Nitroverbindungen (Heubner 1940), (Marquart)

β Aminoverbindungen (Chernhof), (De Gwin), (Krücke),
(Friederiszick), (Hirschler),
(Sandner), (Rajagopalan)

γ Oxidationsmittel (Betke 1956), (Dawson)

δ Redoxfarbstoffe (Beutler)

Siehe Tabelle 1

2. Der reduzierende Enzymmechanismus der Erythrocyten funktioniert nicht. Dies kommt als angeborener Defekt vor. Eine erworbene Störung der enzymatischen Reduktion etwa durch toxische Einwirkung ist bisher noch nicht beobachtet worden.

α Mangelnde Aktivität der Hämoglobinreduktase bei jungen Säuglingen. (Betke 1967)

β Kongenitale Enzymopenien. (Gibson 1948)

γ Mangelnde Bildung von NADH auf Grund einer durch Glutathionmangel verminderte Aktivität der Glycerinaldehyd-3-P-Dehydrogenase. (Townes)

3. Der Blutfarbstoff ist anomal, d.h. er zeigt erhöhte Neigung zur Spontanoxidation oder ist nicht oder nur schwer zu reduzieren. Auch dies kommt als angeborener Defekt vor. (Hb M)

Viele Hämoglobinbildner oxidieren nicht nur das Blutfarbstoffeisen,sonder sie setzen tiefgreifende Schäden am Häm,am Globin und am Erythrocytenstroma,sodaß gleichzeitig Sulfhämoglobin,Heinz'sche Innenkörper und Hämolyse auftreten können.

I Methodik und Versuchsanordnung

A Zielsetzung eigener Untersuchungen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden folgende Untersuchungen durchgeführt:

a Messung der Hämiglobinkonzentration in menschlichen Erythrocyten

1. vergleichende Hämiglobinmessungen unter der Berücksichtigung verschiedener Blutentnahmen und Blut aufbewahrung

-Kapillarblut

-venöses Blut

-venöses Blut + 3.8 % NaCitrat [0.4 ml NaCitrat + Blut ad 2.0 ml]

2. α bei Gesunden

β bei Patienten mit Colitis ulcerosa unter der Therapie mit Azulfidine^R.

γ bei Patienten mit Dermatitis herpetiformis unter der Behandlung mit DADPS^R.

b α Messung der Hämiglobinreduktion nach Inkubation mit Laktat während der Therapie und im Auslassversuch bei Patienten mit Colitis ulcerosa und Dermatitis herpetiformis und bei Normalpersonen.

β Aktivitätsmessung der Hämiglobinreduktase im optischen Test mit 2,6-dichlorphenolindophenol (DCP) als Substrat in Erythrocytenhämolysaten.

c Messung der Hämiglobinbildung und der Hämiglobinreduktion nach Inkubation der Erythrocyten mit Azulfidine^R und DADPS^R.

d Aufzeichnen von Spektralkurven von Bluthämolysaten von Patienten und Normalpersonen.

e Hämiglobinbildung in Abhängigkeit von Ausdehnung und Aktivität der Colitis ulcerosa.

f Messung der Heinzkörperbildung spontan und nach Inkubation mit β -Acetylphenylhydrazin (Beutler Test)

g Messung des Haptoglobins im Serum ,wobei wir eine Verminderung unter 50.0 mgProz. als Zeichen für eine Hämolyse deuteten.

h Messung der Aktivitäten folgender Erythrocytenenzyme bei ausgewählten Patienten⁺

Glutathionreduktase (NADPH abhängig)

Glutathionreduktase (NADH abhängig)

Glukose-6-P-Dehydrogenase

6-Phosphoglukonat-Dehydrogenase

Hexokinase

GSH

GSH Stabilität (in Proz.Abfall nach 2 Std.)

⁺für die Ergebnisse danke ich Herrn K.M.Goebel aus der Med.Poliklinik der Universität Marburg

B Untersuchungsgut

Im Verlauf von 18 Monaten wurde bei den Patienten der Colitis Ambulanz der Med.Universitätsklinik regelmäßig das Hämoglobin bestimmt. Die Untersuchungen erfolgten etwa alle drei Monate. Untersucht wurden insgesamt 67 Patienten (Colitis ulcerosa 59, Morbus Crohn 5, Kolondivertikulitis 3), von denen 52 zumindest zeitweise Azulfidine^R in einer Dosis von 2-8 g/die erhielten. 15 Patienten brauchten während des Beobachtungszeitraumes keine Therapie. Unter diesen beobachteten wir nur einmal eine geringe Hämoglobinbildung. Die Einnahme anderer Medikamente konnte bei diesen Patienten nicht sicher ausgeschlossen werden. Siehe Tabelle 2

Außerdem wurden bei 5 Patienten der Dermatologischen Universitätsklinik mit Dermatitis herpetiformis der Hämoglobingehalt und die Hämoglobinreduktion bestimmt, während und ohne Therapie mit DADPS^R.

C Methode der Messungen

a Hämoglobinmessung

Die Hämoglobinkonzentration in menschlichen Erythrocyten wurde nach der Standardmethode (Evelyn und Malloy) gemessen. Genaue Beschreibung siehe Teil 1.

b Messung der Hämoglobinreduktase und der Hämoglobinreduktion

Die Aktivität der Hämoglobinreduktase wurde teilweise unverändert, teilweise nach eigener Modifikation der Methode nach Tönz (Tönz 1968) bestimmt. Die Hämoglobinreduktion wurde nach der Methode nach Tönz (Tönz 1968) gemessen. Eingehende Beschreibung siehe Teil 1.

c Messung der Hämoglobinbildung in vitro unter Zusatz von Azulfidine^R und DADPS^R zu einer Erythrocyten-suspension.

Zu einer Erythrocytensuspension wurde ein Puffer-Salz-

gemischt gegeben, in welchem eine bestimmte Menge Azulfidine^R bzw. DADPS^R gelöst worden war. Um das Azulfidine^R in Lösung zu bringen, wurde die Mischung zuerst mit 1 n Natronlauge alkalisiert und nach vollständiger Lösung mit 1 n Salzsäure auf pH= 7,3 eingestellt. Für die Lösung des DADPS^R wurde die Lösung zuerst mit 1 n Salzsäure angesäuert (pH=5,5) und nach Lösung des DADPS^R mit 1 n Natronlauge auf den pH=7,0 eingestellt. Beide Lösungen wurden mit Puffer-Salz-Mischung (Herstellung siehe Teil 1) auf verschiedene Konzentrationen gebracht und zu einer gleichen Menge Erythrocytensuspension gegeben.
Siehe Tabelle 3

d Aufzeichnen von Spektralkurven

Es wurden einige Spektralkurven (Spektralphotometer Zeiss EPQ 20a) von Erythrocytenhämolysaten aufgezeichnet, um evtl. pathologische Hämiglobine bei Hämoglobinämien aufzudecken.

Die Heinzkörperbildung und die Haptoglobinmessung wurde in den Laboratorien der Med. Klinik als Routine-messung bestimmt.

II Ergebnisse⁺

a Messung der Hämiglobinkonzentration in menschlichen Erythrocyten.

1. Vergleichende Messungen des Hämiglobingehaltes bei verschiedenen Blutentnahmearten und nach verschiedener Aufbewahrung ergaben:

Es wurde bei jeder Person kapillares Blut als Kontrollprobe entnommen. Dieser Wert wurde als 100 % angenommen und die anderen Werte dazu in Relation gesetzt.

Hierbei zeigt sich, daß der Unterschied zwischen kapillarem und venösem Blut sehr gering ist, wohin- gegen NaCitrat (entsprechend der Abnahme für die Blutsenkung n.W.) das Ergebnis schon verfälschen kann. Der Zusatz von ACD, wie in der Blutkonserve, nimmt den Raum zwischen den beiden anderen Ergebnissen ein.

Siehe Abbildung 8

2. Vergleich der Hämiglobinkonzentration in verschiedenen Kollektiven:

Als Grundlage zum Vergleich wurde die Normalkonzentration bei einem nicht ausgewählten Kollektiv gemessen. Es wurde nur soweit ausgewählt, daß kein Patient der Colitis ulcerosa Ambulanz mit in das Normalkollektiv genommen wurde, auch wenn er keine Medikamente eingenommen hatte.

Tabelle 4 zeigt, daß bei den behandelten Patienten 63 % der gemessenen Werte im Normbereich liegen wobei aber noch 15 % der Werte in dem Bereich zwischen 2.0 - 3.0 % liegen; dahingegen ist bei keinem unbehandelten Patienten die Hämiglobinkonzentration über 1.2 %.

Die Tabelle zeigt weiterhin, daß bei der Dermatitis herpetiformis unter der Behandlung mit DADPS^R noch höhere Hämiglobinwerte gemessen wurden.

⁺ Teilergebnisse wurden bei der 76. Tagung der deutschen Gesellschaft für Innere Medizin Wiesbaden 1971 referiert.

Von den 51 mit Azulfidine^R behandelten Patienten zeigten 34 [67 %] eine leichte Hämoglobinbildung mit Werten über 1.2 % .

Insgesamt war von den 34 hämoglobinbildenden Patienten bei 15 der Zusammenhang mit der Medikamenteneinnahme deutlich. Die Abbildung 2 zeigt den Zusammenhang von Hämoglobinbildung und Azulfidine^R Einnahme an vier Einzelbeispielen. Bei der ersten Patientin zwang gleichzeitiges Erbrechen zum Absetzen des Medikamentes.

6 Patienten zeigten trotz regelmäßiger Einnahme nur während aktiver Krankheitsphasen erhöhte Hämoglobinwerte. 2 Patienten ließen beide Abhängigkeiten erkennen. 11 Patienten zeigten wechselnd erhöhte oder normale Hämoglobinwerte trotz gleicher Azulfidine^R Dosis und klinisch gleichbleibender Aktivität. Die Abbildung 3 zeigt zwei Beispiele bei denen ein stärkerer Anstieg des Hämoglobinwertes während Colitisrezidiven beobachtet wurde.

Dagegen bestand kein Zusammenhang zwischen der röntgenologisch feststellbaren Ausdehnung der Colitis und dem Auftreten von Hämoglobin.

Siehe Abbildung 4

Eine strenge Dosisabhängigkeit war, wahrscheinlich als Folge zusätzlicher individueller Faktoren, an unserem Gesamtmaterial statistisch nicht zu sichern. Siehe Abbildung 5

An einzelnen Personen konnte die Abhängigkeit jedoch beobachtet werden. Siehe Abbildung 6

Immerhin lagen bei den hämoglobinbildenden Patienten während Perioden ohne Therapie 84 % aller gemessenen Hämoglobinwerte im Normbereich, unter Azulfidine^R-Dosis bis 3 g/d waren es nur noch 40 % , bei Dosen über 3 g/d nur 33 % . Siehe Abbildung 7

- b Messung der Hämoglobinreduktion nach Inkubation mit Laktat bzw. Messung der Hämoglobinreduktaseaktivität. Siehe Teil 1

Als Ergebnis kann festgestellt werden, daß im gesamten Kollektiv, durch die biologische Streuung bedingt, keine signifikanten Unterschiede gegenüber Gesunden gefunden werden konnte.

Im Expositions- und Auslassversuch bei 3 Gesunden und 2 Patienten mit Colitis ulcerosa konnte unter Azulfidine^R ein signifikanter Unterschied der Hämoglobinreduktion und erhöhte Hämoglobinbildung dargestellt werden, sodaß eine Aktivitätsminderung und eine erhöhte Hämoglobinbildung durch Azulfidine^R möglich sein kann.

- c Messung der Hämoglobinbildung und der Hämoglobinreduktion nach Inkubation der Erythrocyten mit Azulfidine^R und DADPS^R.

Nach Inkubation der Erythrocyten mit verschiedenen Konzentrationen von Azulfidine^R und DADPS^R, wurde über einem Zeitraum von 3 Stunden der Hämoglobin-gehalt der Suspension gemessen. In der Abbildung 9 erkennt man, daß keine Hämoglobinbildung stattfindet. Ebenso besteht keine Abhängigkeit zur Medikamentenzugabe.

Damit stimmen wir mit Thauer (1965) überein, der feststellte, daß keine Hämoglobinbildung stattfinden

kann, da nur das Abbauprodukt Arylhydroxylamin, das in der Leber gebildet wird, eine Hämoglobinbildung hervorrufen kann.

Nach beschriebener Inkubation von 3 Stunden wurde die Hämoglobinreduktion im Laufe von vier Stunden gemessen und festgestellt, daß keine Abnahme der Hämoglobinreduktion gegenüber der Norm stattfindet. Siehe Abbildung 10

d Während der weiteren Untersuchungen nahmen wir auch einige Spektralkurven von Normalpersonen und von Patienten mit geringer Hämoglobinbildung auf, um ggf. eine Globinvariante zu entdecken. (Zeiss Spektralphotometer RPQ 20 a) (Kiese)(Gerald)(Tönz 1962). Bei der Betrachtung der Abbildung 11 erkennt man, daß die Kurven mit der Kurve, die Tönz (Tönz 1968) angegeben hat übereinstimmen. In die gleiche Abbildung wurde die Hämoglobinkurve des HbM (Tönz 1968) eingezeichnet. Sämtliche Erythrocytenhämolysate wurden vorher mit Kaliumferricyanid versetzt, um das Hämoglobin in Hämoglobin umzuwandeln.

e Hämoglobinbildung in Abhängigkeit von Ausdehnung und Aktivität der Colitis ulcerosa.

Wie schon beschrieben erkennt man in der Abbildung 4, daß trotz weiterer Ausdehnung bis einschließlich des gesamten Kolons die Hämoglobinbildung nicht zugenommen hat. Ebenso ergibt die Aktivitätszunahme keine signifikante Erhöhung der Hämoglobinkonzentration.

f Während der Azulfidine^R Behandlung beobachteten wir jedoch nicht nur eine geringe Zunahme der Hämoglobinwerte, sondern in zusätzlichen Untersuchungen auch Hinweise für eine Beeinträchtigung der Stoffwechselleistung in den Erythrocyten. Bei 15 (44 Proz.) der 34 hämoglobinbildenden Patienten fanden wir im Beutler Test eine gesteigerte Anfälligkeit für Heinzkörperbildung. [über 15 Proz. der Erythrocyten mit mehr als 4 Heinzkörpern]

Setzt man die Heinzkörperbildung in Relation zur Menge der eingenommenen Medikamentendosis, so kann keine Abhängigkeit festgestellt werden. Siehe Abbildung 12

Einzelnen Patienten mit stärkerer Hämoglobinbildung zeigten nach Inkubation mit β -Acetylphenylhydrazin eine vermehrte Heinzkörperbildung.

- g Da wegen häufigen chronischen Blutverlustes eine Anämie, die Retikulozytenzahl und der Serumeisenspiegel nicht als Kriterium einer Hämolyse verwertbar sind, bestimmten wir das Haptoglobin im Serum und deuteten eine Verminderung unter 50 mg % als Zeichen für eine Hämolyse. Bei 13 Patienten (38 %) der 34 Patienten, die Hämoglobin bildeten fanden wir eine gesteigerte Hämolyse; 9 Patienten (26 %) hatten dabei sowohl eine vermehrte Anfälligkeit für Heinzkörperbildung, als auch Zeichen vermehrter Hämolyse. Die Heinzkörperbildung und Hämolyse korrelierten mit der Höhe der Hämoglobinwerte. Es konnte jedoch keine Abhängigkeit zwischen der eingenommenen Dosis von Azulfidine^R und der Hämolyse bzw. Heinzkörperbildung festgestellt werden. Siehe Abbildung 13, 14 und 15

- h Mit der Frage, ob Defekte an Erythrocytenenzymen als Ursache der vermehrten Hämoglobinbildung bei einzelnen Patienten eine Rolle spielen, bestimmten wir bei 6 Patienten mit stärkerer Hämoglobinbildung die Aktivitäten der Erythrocytenenzyme der Glykolyse und des Pentosephosphatzyklus mit Standardmethoden[†] (Waller). Ein Enzymdefekt konnte nicht nachgewiesen werden. Vielmehr fanden sich erhöhte Glutathionreduktasewerte, die wir in Übereinstimmung mit anderen Autoren (Michot) auf die indirekte Enzymaktivierung bei Hämoglobinämie zurückführen. Siehe Tabelle 5

Für die Ergebnisse danke ich Herrn Kl. M. Goebel aus der Medizinischen Poliklinik Marburg

III. Diskussion

Angeregt durch eine Einzelbeobachtung untersuchten wir bei allen Patienten der Colitis ulcerosa Ambulanz der Medizinischen Klinik die Hämiglobinkonzentration der Erythrocyten. Hiervon gingen wir, wie Heubner, (Heubner 1950) Hurschler (Hurschler 1941), Moser (Moser 1950), und Bodansky (Bodansky) davon aus, daß bei dem Sulfonamid Azulfidine^R, welches 1941 von Svartz (Svartz 1941) in die Therapie eingeführt wurde, die Möglichkeit der Hämiglobinbildung besteht.

Die Hämiglobinbildung schwankte zwischen Werten von 0 % und 7.2 % als Höchstwert. Um nun festzustellen, ob die Hämiglobinbildung von Azulfidine^R abhängig ist, stellten wir die Korrelation zwischen der eingenommenen Azulfidine^R Dosis und den Hämiglobinwerten her. Es konnte jedoch keinerlei signifikante Korrelation abgeleitet werden. Da bei einigen Patienten jedoch auffiel, daß die Hämiglobinbildung von der Einnahme von Azulfidine^R abhing, untersuchten wir bei 5 Versuchspersonen diese Abhängigkeit. Hier konnte eine direkte Abhängigkeit dargestellt werden. Diese verschiedenen Ergebnisse im Gesamtkollektiv und bei Einzelpersonen erklären wir durch die individuellen Empfindlichkeit bei der Hämiglobinbildung.

Weiterhin besteht die Möglichkeit, daß eine Abhängigkeit zwischen der Aktivität der Colitis ulcerosa und der Hämiglobinbildung besteht. Auch hier konnten wir im Gesamtkollektiv keine direkte Abhängigkeit feststellen, was jedoch bei Einzelpersonen möglich war.

Da außerdem zu diskutieren ist, ob nicht eine erhöhte Resorption des Sulfonamides in den erkrankten Darmabschnitten besteht, versuchten wir eine Korrelation zwischen der röntgenologisch erfassten Ausdehnung und der Hämiglobinbildung aufzuzeigen. Auch hier zeigte sich keine Abhängigkeit, sodaß eine erhöhte Resorption wahrscheinlich auszuschließen ist.

Um festzustellen, ob die induzierte Hämiglobinbildung direkt von dem Sulfonamid oder von Abbauderivaten ab-

hängig ist,versuchten wir in vitro eine Hämiglobinbildung durch Inkubation der Erythrocyten mit dem Sulfonamid Azulfidine^R und dem Sulfon DADPS^R hervorzurufen. Hierbei konnte keine Hämiglobinbildung ausgelöst werden, da zur Induzierung deren Abbauprodukte die Hydroxylamine notwendig sind.Somit erhielten wir dieselben Ergebnisse wie Thauer.(Thauer).

Da die Abbauprodukte in der Leber gebildet werden (Thauer),spielen neben der Resorptionsgeschwindigkeit auch noch die Abbaugeschwindigkeit in der Leber und die Eliminationsgeschwindigkeit der Abbauprodukte eine Rolle,sodaß allein dadurch die verschiedene Hämiglobinbildung erklärt werden kann.

Da schon von anderen Autoren die Hämiglobinbildung durch ein pathologisches Hämoglobin beschrieben wurde (Kiese) (Tönz 1968)(Gerald),zeichnetenwir bei verschiedenen Patienten die Spektralkurve des Hämolysates nach Umwandlung des Hämoglobins in Hämiglobin auf.Im Vergleich zu den Spektralkurven, die Tönz (Tönz 1968) angegeben hat,zeigt sich die Übereinstimmung mit normalen Spektralkurven.Das normale Hämiglobin unterscheidet sich von dem HbM,beide umgewandelt in Hämiglobin darin,daß der normale Verlauf einen Gipfel bei 630 nm und 500 nm,sowie ein Tal bei 600 nm darstellt,wohingegen bei dem HbM bei 600 nm ein Plateau gebildet wird und der zweite Gipfel nach 485 nm in den kurzwelligen Bereich verschoben ist. Somit konnte keine Veränderung im Sinne einer HbM-Bildung aufgezeigt werden.

Neben der Hämiglobinbildung sind nicht selten Heinz-Körper,sowie eine gesteigerte Hämolyse nachweisbar. (Böttiger)(Roth)(Spriggs).

Bei 44 % der hämiglobinbildenden Patienten fanden wir im Beutler Test eine gesteigerte Anfälligkeit für Heinz-Körperbildung [über 15 % Erythrocyten mit mehr als 4 Heinzkörpern].Versucht man jedoch eine Korrelation zwischen Eisenmangel oder Medikamentendosis bzw.gebildetem Hämiglobin und der Heinzkörperbildung aufzustellen,so kann nur zwischen der Hämiglobinkonzentration und der

Heinzkörperbildung eine Abhängigkeit aufgezeigt werden.

Die Auswirkungen der Therapie auf eine Hämolyse untersuchten wir durch Bestimmung des Haptoglobins im Serum. Die anderen Hämolysezeichen, wie Retikulozytenzahl, der Serumeisenspiegel und das Hämoglobin erschien uns zu ungenau, da durch den chronischen Blutverlust eine Störung hervorgerufen werden kann. Als pathologisch deuteten wir eine Verminderung des Haptoglobins unter 50 mg % und somit als Zeichen für eine gesteigerte Hämolyse.

9 Patienten hatten dabei sowohl eine gesteigerte Anfälligkeit für Heinzkörperbildung, als auch Zeichen der gesteigerten Hämolyse.

Bei weiteren Untersuchungen stellten wir uns die Frage, ob Defekte an Erythrocytenenzymen als Ursache der vermehrten Hämiglobinbildung bei einzelnen Patienten die Ursache sein können, da andere Autoren dies schon früher beschrieben haben. (Moser 1968) (Waller) (Ross) (Scott 1959) (Gärtner). Daraufhin untersuchten wir bei einem Kollektiv die Hämiglobinreduktase [siehe Teil 1] und bei einzelnen Patienten mit erhöhten Hämiglobinwerten die Aktivitäten der Erythrocytenenzyme der Glykolyse und des Pentosephosphatzyklus mit Standardmethoden.⁺

(Waller) Ein Enzymdefekt konnte nicht nachgewiesen werden. Vielmehr fanden sich erhöhte Glutathionreduktasewerte, die wir, übereinstimmend mit anderen Autoren (Michot), auf die indirekte Enzymaktivierung bei Hämiglobinämie zurückführen. Die Bestimmung der Hämiglobinreduktaseaktivität [in intakten Zellen bei Inkubation mit Laktat (Tönz 1968), in Hämolysaten mit 2,6-dichlorphenolindophenol als Substrat (Scott 1960) (Tönz 1968)] zeigte dagegen keine Unterschiede zwischen hämiglobinbildenden Patienten, während und ohne Azulfidine^R-Therapie, und einem gesunden Kontrollkollektiv. (siehe Teil 1)

IV Graphische Auswertung der Ergebnisse und Tabellen

B Zusammenfassung

Im Teil 1 der Arbeit wird die Hämoglobinreduktase mit verschiedenen Methoden gemessen. Es wird weiterhin die Abhängigkeit verschiedener Komponenten, wie Substratkonzentrationen und pH untersucht.

Bei der Messung der Hämoglobinreduktase bei Colitis ulcerosa Patienten und Patienten mit Dermatitis herpetiformis kann festgestellt werden, daß im gesamten Kollektiv, durch die biologische Streuung bedingt, keine signifikanten Unterschiede gegenüber Gesunde gefunden werden konnte.

Im direkten Vergleich einzelner Personen war der Unterschied mit und ohne Medikation jedoch signifikant, sodaß eine Beeinflussung der Hämoglobinreduktion und erhöhte Hämoglobinbildung durch Azulfidine^R möglich ist.

Im Teil 2 der Arbeit wurden die klinischen Auswirkungen der Therapie mit Azulfidine^R untersucht. Bei etwa 67 % der Patienten kommt es zu einer geringen Hämoglobinbildung, die jedoch keine Abhängigkeit zur Dosis erkennen läßt. Nur selten gingen die erhöhten Hämoglobinwerte mit subjektiven Beschwerden, wie Kopfschmerzen, Übelkeit und Erbrechen einher, die zu einer Absetzung der Medikation führten. (5%) Umgekehrt fanden wir aber stets erhöhte Werte, wenn diese Beschwerden auftraten. Eine in vitro durchgeführte Inkubation der Erythrocyten mit Azulfidine^R und DADPS^R zeigte keine Hämoglobinbildung und keine Verminderung der Hämoglobinreduktion.

Eine erhöhte Hämoglobinbildung in Abhängigkeit von der Ausdehnung der Krankheit [röntgenologisch] konnte im Kollektiv nicht erbracht werden.

Neben der Hämoglobinbildung sind nicht selten Heinzkörperbildung und Zeichen einer gesteigerten Hämolyse nachweisbar. Es bestand nur eine Abhängigkeit zwischen der Hämoglobinkonzentration und der Heinzkörperbildung bzw. der Hämolyse (Haptoglobinwerte), jedoch nicht zwischen der Medikamentendosis von Azulfidine^R und der Heinzkörperbildung bzw. der Hämolyse (Haptoglobinwerte).

Als Ursache der erhöhten Hämiglobinwerte scheint pathogenetisch eine verminderte Hämiglobinreduktion keine Rolle zu spielen. Eine individuell unterschiedliche Steigerung der Hämiglobinbildung wäre möglich infolge von Unterschieden in der Pharmakodynamik des Medikamentes, z.B. einer vermehrten Resorption, einer vermehrten Entstehung hämiglobinbildender Metaboliten oder einer verzögerten Elimination der Metabolite. Der Einfluß der Colitisaktivität bei einzelnen Patienten könnte in diese Richtung deuten.

Nitroverbindungen	Arzneimittel
Nitrose Gase, anorganische Nitrite und Nitrate, Nitroverbindungen aliphatischer und aromatischer organischer Substanzen.	anorganische und organische Nitropräparate, Wismutsubnitrat, Nitrofurantoin.
Aminoverbindungen	Arzneimittel
Hydrazin, Hydroxylamin und deren Derivate, Anilin und seine Derivate, p-Aminobenzoesäure, Sulfonamide.	Anästhesin, Atebrin, Azetanilid, Phenacetin, Plasmochin, Sulfonamide (Azulfidine ^R), Sulfone (DADPS ^R)
Oxidationsmittel	Arzneimittel
Chlorate, Ferricyankalium, Polyoxybenzole, Chinone, Pyridin, polizyklische Verbindungen (Naphthalin)	Kaliumchlorat, Teer, Lysol, Resorcin, Guajakol, Perubalsam, Kreosot.
Redoxsubstanzen	Arzneimittel
Kresylblau, Capriblau	Phenothiazin

Tabelle 1

Substanzen, die zu einer Hämoglobinämie führen

Krankheit	männl.	weibl.	gesamt
Colitis ulcerosa	36	23	59
Kolondivertikulitis	2	1	3
Morbus Crohn	3	2	5
Dermatitis herpetiformis	5		5

Tabelle 2

Aufschlüsselung der untersuchten Patienten nach ihren Krankheiten und Geschlecht

Azulfidine ^R mg %	1.0	2.0	4.0 ⁺	8.0	16.0	32.0
DADPS ^R mg %	1.0	2.0	4.0	8.0	16.0 ⁺⁺	

Tabelle 3

Konzentrationen von Azulfidine^R und DADPS^R bei in vitro Versuche.

⁺ entspricht einer Tagesdosis von 6.0 g Azulfidine^R (Böttiger)

⁺⁺ entspricht einer Tagesdosis von ca. 50 mg DADPS^R (Morgan)

Kollektiv	Anzahl d.Pat.	Anzahl d.Mes- sungen	Verteilung der Hämiglobinwerte [%]				
			0.0-1.1	1.2-2.0	2.1-3.0	3.1-5.0	>5.0
Normal	24	34	34 100%				
Col.ulc. behandelt	52	89	56 63%	16 18%	13 15%	3 3%	1 1%
Col.ulc. unbeh.	15	15	15 100%				
Derm. herpet.	5	10	5 50%	1 10%	1 10%	2 20%	1 10%

Tabelle 4

Hämiglobinkonzentration bei verschiedenen Kollektiven,
mit Verteilung auf einzelne Konzentrationsabschnitte.

Enzym	M	+S	D.J	M.J	W.L	G.S	D.S	K.S	H.W
Glutathion Reduktase (NADPH abh.)	10.3	1.9	8.9	12.5	10.5	28.2	12.8	18.8	16.2
Glutathion Reduktase (NADH abh.)	2.1	0.5	2.1	1.6	1.6	7.7	3.2	5.6	9.8
Glukose-6-P Dehydrogenase	17.9	2.0	18.0	18.3	17.9	15.0	14.5	15.6	15.5
6 Phosphoglu- konat-Dehydro- genase	11.7	1.8	12.4	10.5	18.1	9.7	12.6	13.5	13.7
Hexokinase	1.5	0.3	6.3	3.2	3.2	2.2	1.80	3.3	2.7
GSH	2600	321	3900	3100	2690	2900	3860	2700	4400
GSH Stabili- tät (in Proz. Abfall in 2 Std.)	<25 %		57	11	18	31	33	41	36
ATP	1280	126	1740	1640	2480	1245	2600	1010	2080

Enzymaktivitäten in Internationalen Einheiten =U/10¹¹

Erythrocyten [1 U= 1 Mikromol Substratumsatz/Min.bei
25° C, pH=7,5]

GSH und ATP in η Mol pro ml Erythrocyten.

Tabelle 5

Ergebnisse der Erythrocytenenzyme bei einzelnen Colitis
ulcerosa Patienten, die mit Azulfidine behandelt wurden. +

+ für die Ergebnisse danke ich Herrn Kl.M.Goebel aus der
Medizinischen Poliklinik Marburg

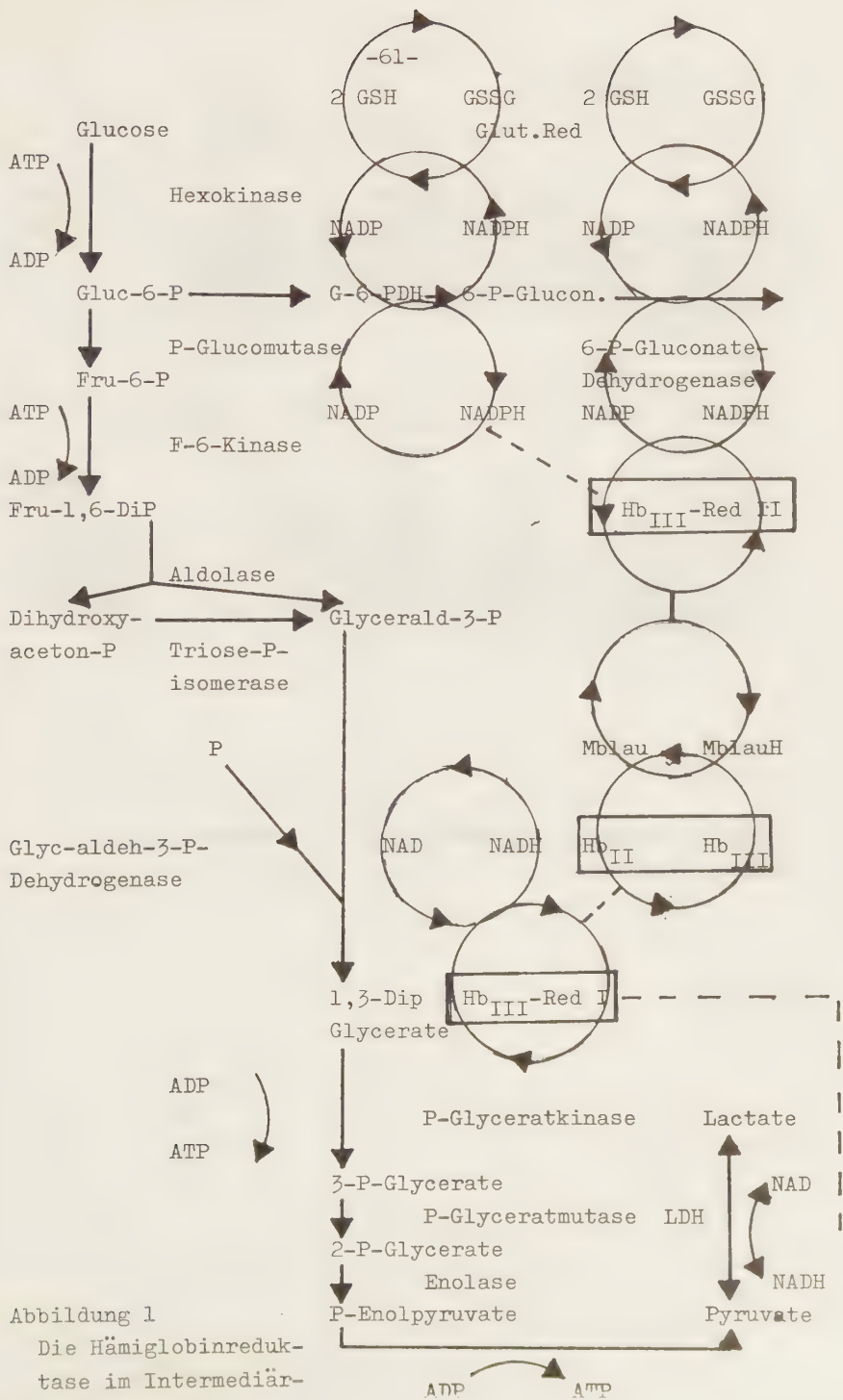


Abbildung 1
Die Hämoglobinreduktase im Intermediärstoffwechsel

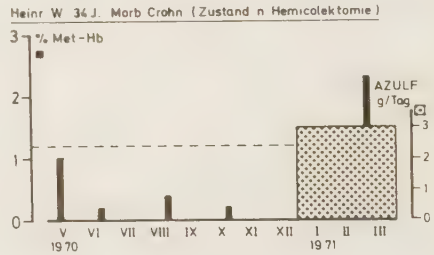
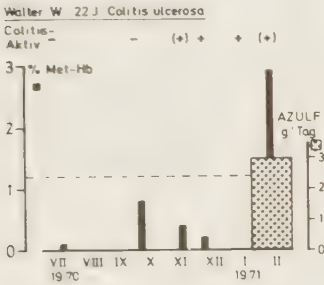
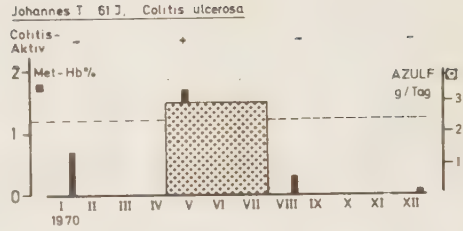
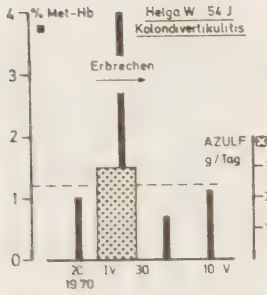


Abbildung 2

Hämoglobinbildung und Azulfidine^R Einnahme an vier Einzelbeispielen.

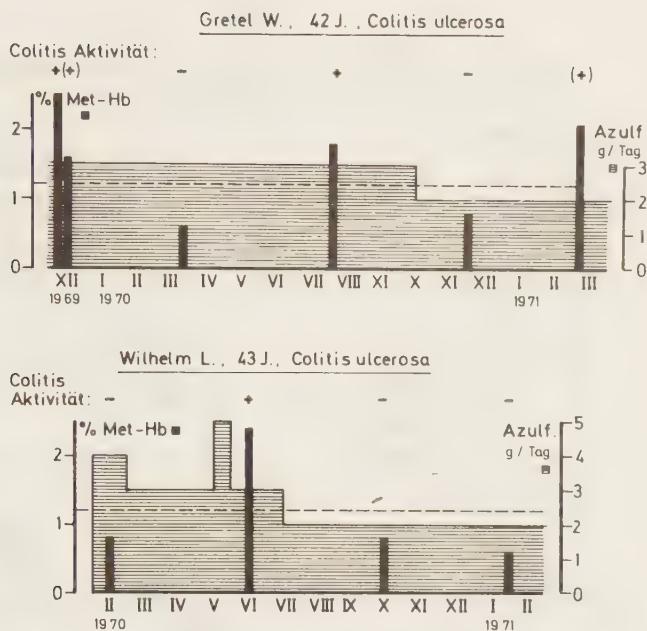


Abbildung 3

Anstieg der Hämoglobinwerte während Colitis Rezidiven bei zwei Patienten

Methämoglobin-Bildung in Abhängigkeit von Ausdehnung u Aktivität der Colitis ulcerosa

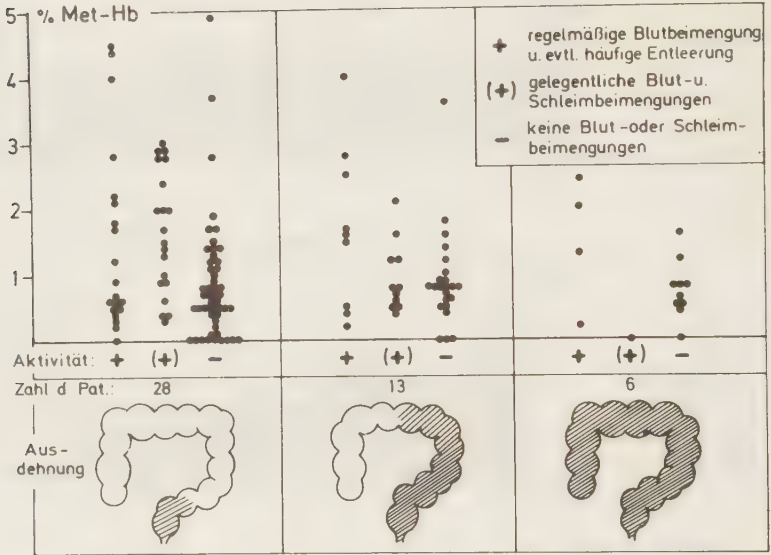


Abbildung 4

Hämoglobinbildung in Abhängigkeit von Ausdehnung und Aktivität der Colitis ulcerosa

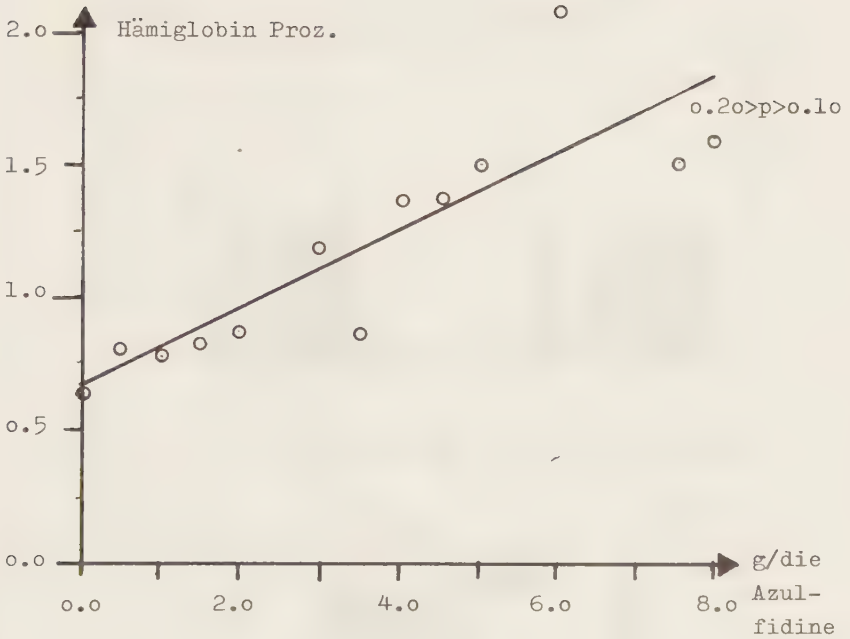


Abbildung 5

Hämoglobinbildung in Abhängigkeit von der eingenommenen Azulfidine^R Dosis bei allen Colitis ulcerosa Patienten. [pro Dosis wurde der statistische Mittelwert genommen]

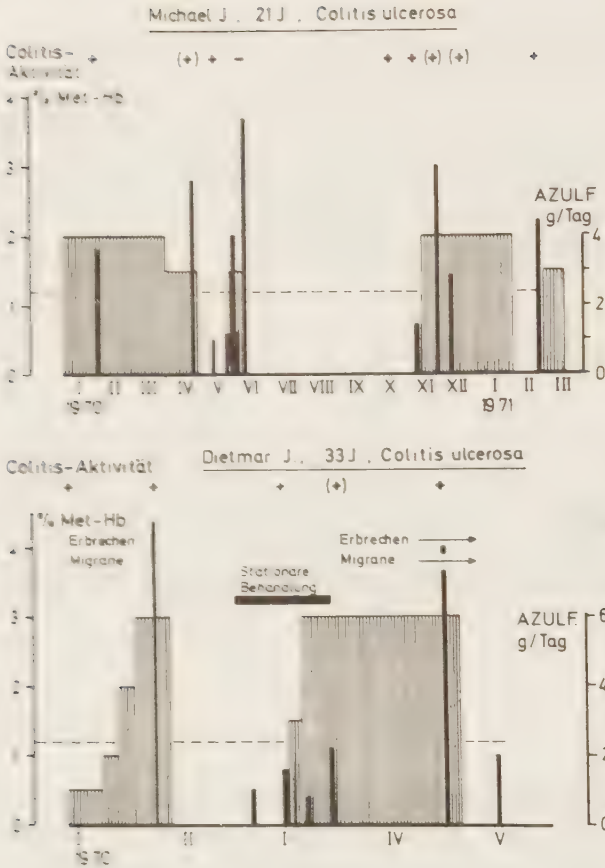


Abbildung 6

Hämoglobinspiegel in Abhängigkeit von Azulfidine^R bei zwei Patienten der Colitis ulcerosa Ambulanz.

Verteilung der Met-Hb-Werte bei Patienten mit
Methämoglobinbildung in Abhängigkeit
von der Azulfidine-Dosis

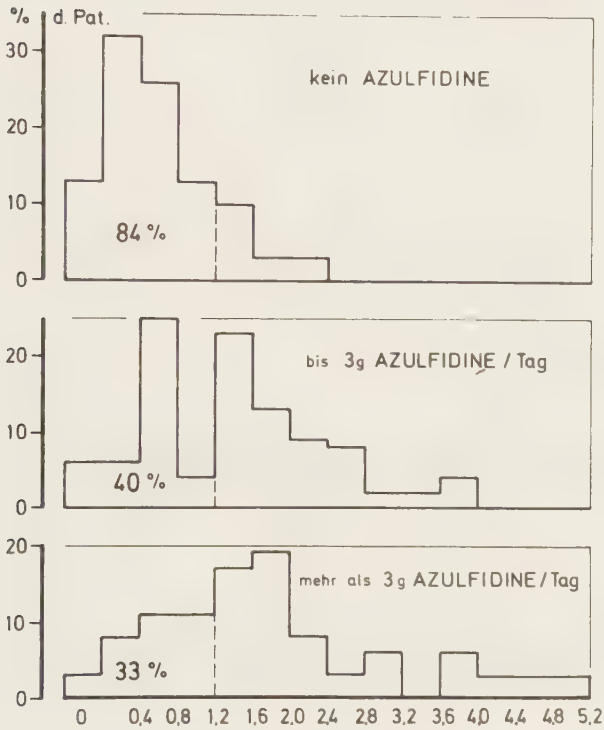


Abbildung 7a

Verteilung der Hämoglobinwerte bei Patienten mit Hämoglobinbildung in Abhängigkeit von der Azulfidine^R Dosis.

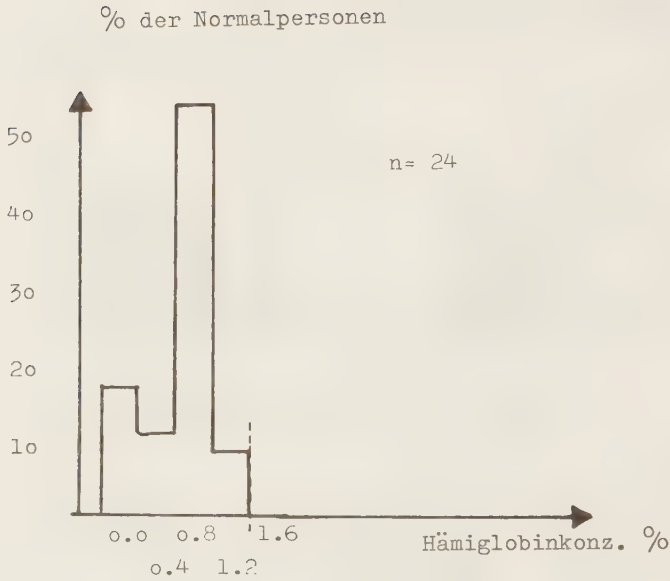


Abbildung 7 b

Verteilung der Hämoglobinwerte eines Normalkollektives
[n=24]

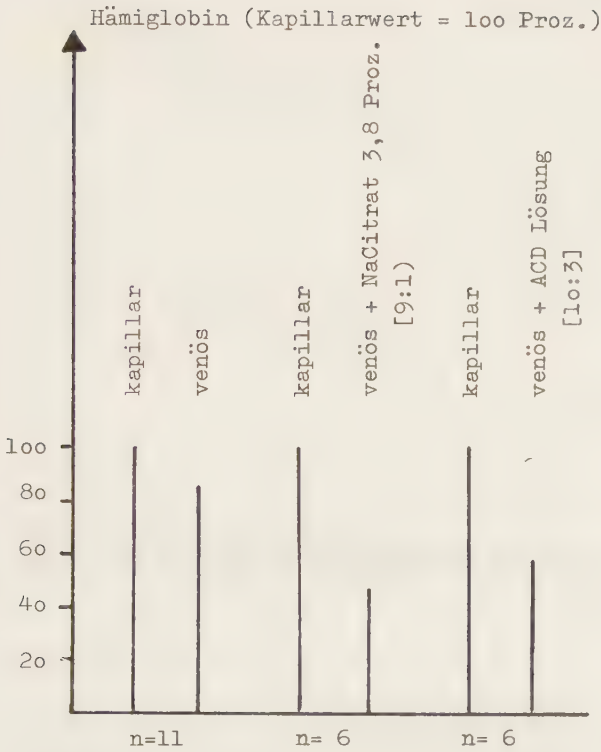


Abbildung 8

vergleichende Hämoglobinmessungen unter der Berücksichtigung verschiedener Blutentnahmen und Blutaufbewahrungen.

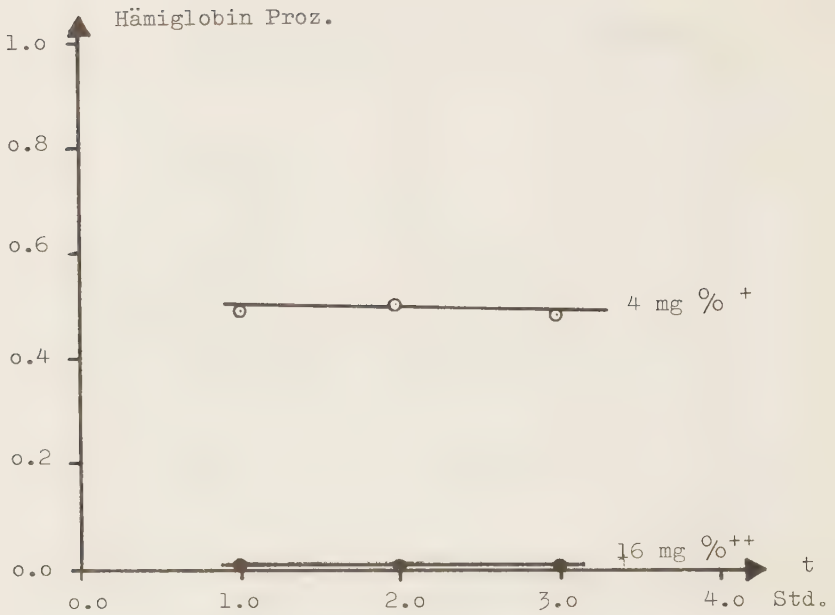


Abbildung 9

Abhängigkeit der Hämoglobinbildung von der Zeit der Inkubation der Erythrocyten mit Azulfidine^R und DADPS^R.

+ entspricht einer Tagesdosis von 6.0 g Azulfidine^R (Böttiger)

++ entspricht einer Tagesdosis von ca. 50.0 mg DADPS^R (Morgan)

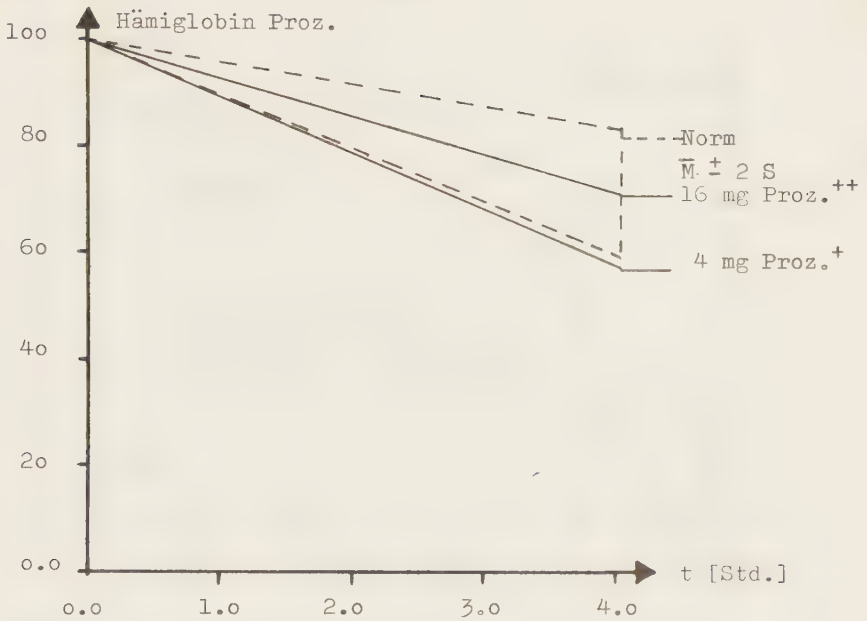


Abbildung 10

Hämoglobinreduktion nach vorheriger 3 Std. Inkubation mit Azulfidine^R und DADPS^R unter Zusatz von Laktat als Substrat

- - - Normbereich $\bar{M} \pm 2 S = 29.25 \pm 12.18$

++ entspricht einer Tagesdosis von ca. 50.0 mg DADPS^R (Morgan)

+ entspricht einer Tagesdosis von 6.0 g Azulfidine^R (Böttiger)

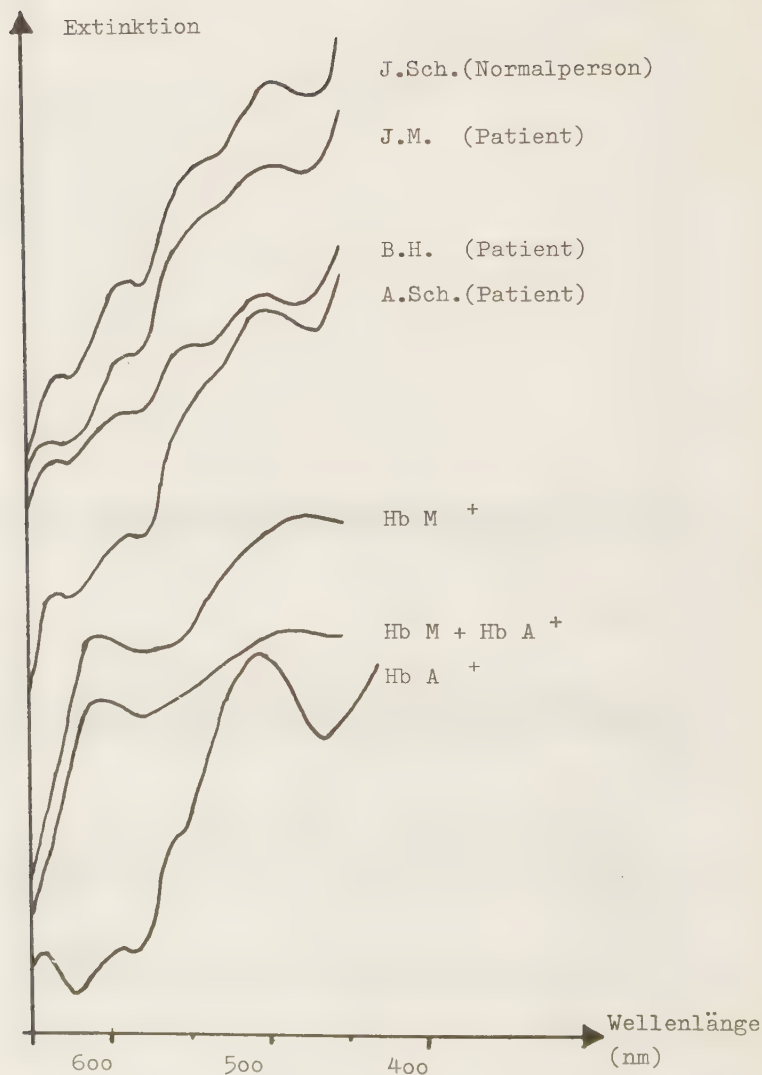


Abbildung 11

Aufzeichnen versch. Spektralkurven (Zeiss Spektralphotometer RPQ 20a). [zu 3 ml Hämolytat wurde 0.05 ml 0.5 Proz. $K_3Fe(CN)_6$ zur Umwandlung von Hämoglobin in Hämiglobin gegeben.]
 +übernommen von Tönz (Tönz 1968)

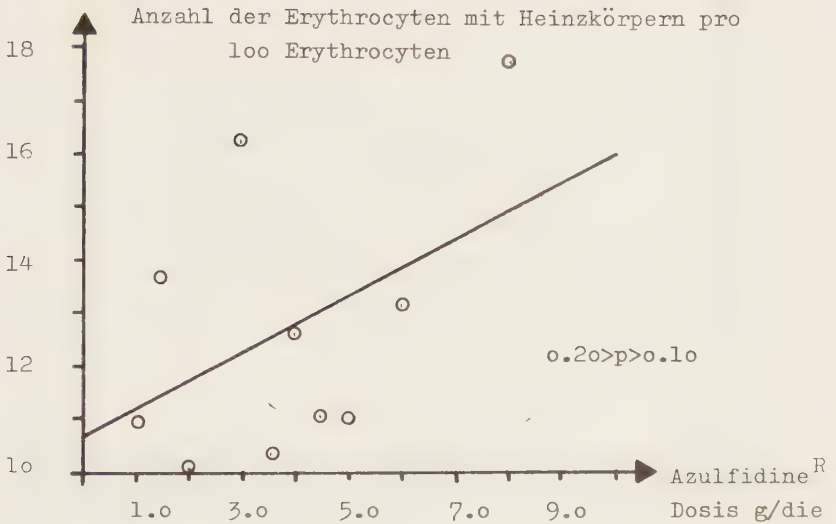


Abbildung 12

Abhängigkeit der Heinzkörperbildung von der Azulfidine^R
Dosis [g/die]

Angegebene Werte = Mittelwerte pro Dosis

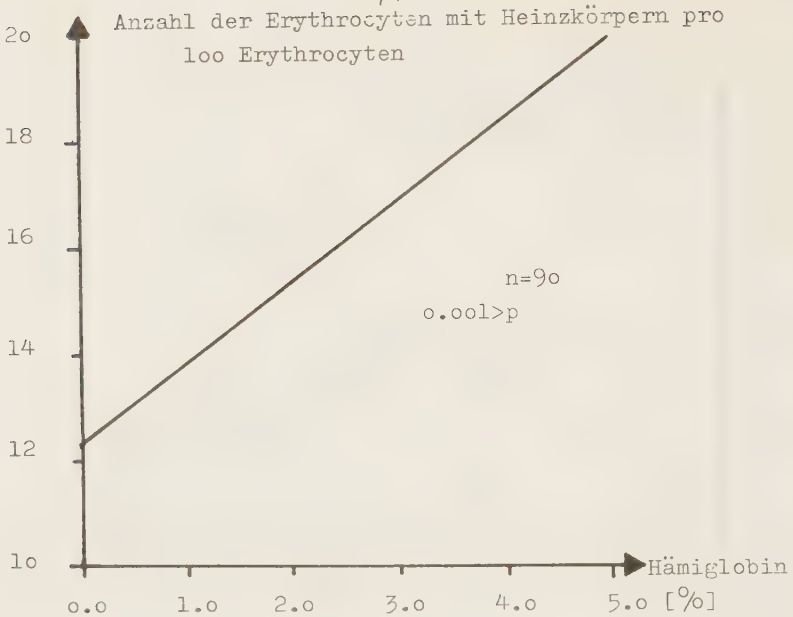


Abbildung 13

Abhängigkeit der Heinzkörperbildung von der Hämiglobin-
konzentration.

nach Inkubation mit β -Acetylphenylhydrazin

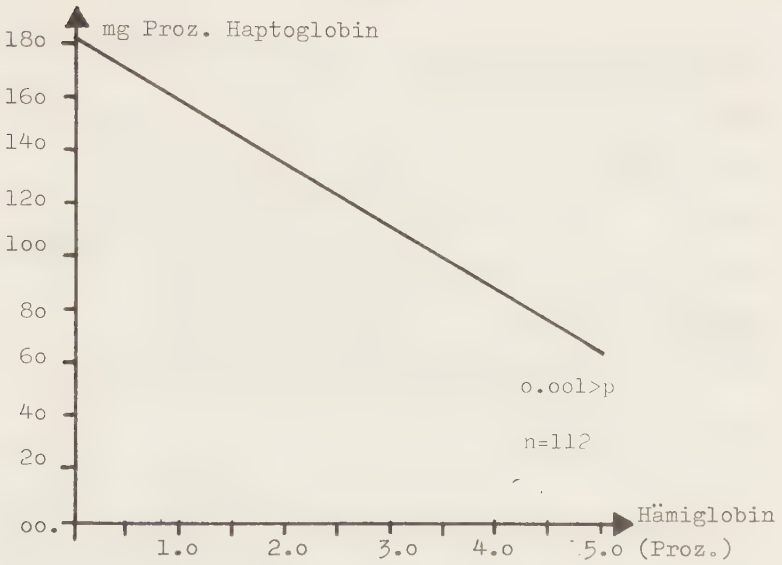


Abbildung 14

Abhängigkeit des Haptoglobinwertes im Serum von der Hämoglobinkonzentration

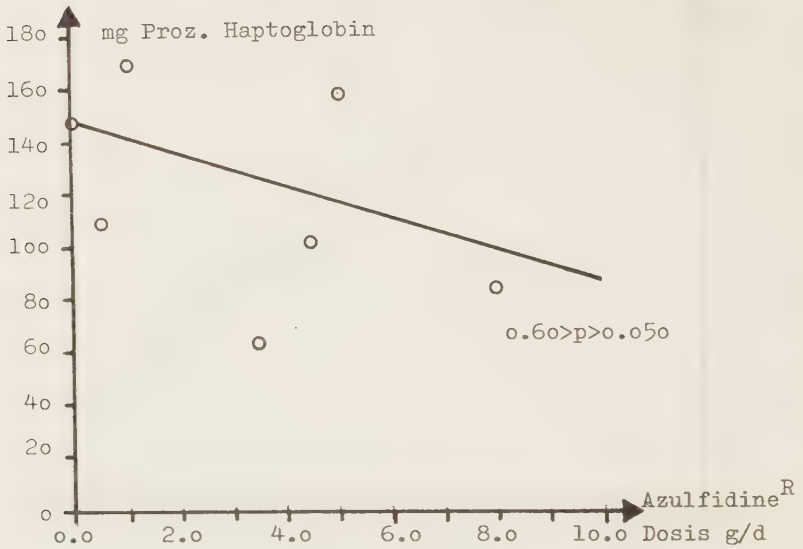


Abbildung 15

Abhängigkeit des Haptoglobinwertes im Serum von der eingenommenen Dosis von Azulfidine^R

Angegebene Werte = Mittelwerte pro Dosis

C Literaturverzeichnis

Azulfidine

Deutsche Pharmacia GmbH Frankf./Main
Druckschrift 1971

Betke,K Schall,H

Akute hämolytische Innenkörperanämie mit
Methämoglobinämie bei einem Neugeborenen,
wahrscheinlich bedingt durch Naphtalin.
Zschr.Kinderheilk.81,379,1956

Betke,K

Methämoglobinämien
Handbuch d.Kinderheilk.6,870,1967 Springer
Verlag

Betke,K

Methämoglobinämien
aus Synthese,Struktur und Funktion des Hämog-
lobins(Hrsgeb.H.Martin,L.Nowicki)Bd.10
Hämatologie und Bluttransfusionen
Lehmanns Verl.München 1972

Beutler,E Baluda,M

Methemoglobin Reduction,Studies of the Inter-
action between Cell Populations and of the
Role of Methylenblue.
Blood,23,323,1963

Bodansky,O

Methemoglobinemia and methemoglobin-
producing compounds.
Pharmacol.Rev.3,144,1951

Böttiger,N.E. Möllerberg,H

Metabolic Studies on Azulfidine,Azudi-
midine and one Analogue.
Acta med.Scand.165,241,1959

Chernhof,D

Dapsone induced Hemolysis in G-6-PD Deficiency. J. Amer. med. Ass. 201, No. 7, 554, 1967

Cohen, R.J. Sachs, J.R. Wicker, D.J. Conrad, M.E.
Five blue soldiers: Methemoglobinemia provoked by antimalarial chemoprophylaxis.
Clin. Res. 16.301, 1968

DADPS

Bayer Leverkusen: zur oralen Behandlung der
Lepra D 1560/1683

Dawson, J Thayer, W Desforbes, J

Acute Hemolytic Anemia in the Newborn infant
due to Naphthalene Poisoning: Report of two
Cases with Investigations into the Mechanism
of the Disease. Blood 8, No. 12 1113, 1958

De Gwin, R

A Review of Therapeutic and Hemolytic Effects
of Dapsone
Arch. intern. Med. 120, No. 2 242, 1967

Denning, H

Lehrbuch der Innere Medizin
7. Auflage Band II, 73 1966 Georg Thieme
Verlag Stuttgart

Eder, H Finch, A Mc Kee, R

Congenital methemoglobinemia. A clinical
and biochemical study of case.
J. clin. Invest. 28, 265, 1949

Evelyn, K Malloy, H

Microdetermination of Oxyhemoglobin, Methemoglobin and Sulfhemoglobin in a single
Sample of blood.
J. biol. chem. 126, 655, 1938

Finch,C

Methemoglobinemia and sulfhemoglobinemia
New.Engl.J.Med.239,470,1948

Fischbach,E

Die Nitritvergiftungen des Blutes
Münch.med.Wschr.100,855,1958

Friederiszick,K Toussaint,W

Nebenwirkungen eines modernen Langzeit-
sulfonamids bei therapeutischer Anwendung
im Säuglingsalter.
Med.klin.55,459,1960

Gardner,M.D. Bagen,J.A.

hemolytic anemia secondary to Salicylazo-
sulfapyridine therapy.
JAMA 190,71,1964

Gärtner,Ch

geringere Aktivität der DPN-abhängigen
Methämoglobinreduktase in Neugeborenenery-
throcyten als Ursache der Minderleistung
bei der Methämoglobinreduktion.
J.biol.chem.126,655,1938

Gerald,P.

The Electrophoretic and Spectoscopic
Characterization of Hgb M.
Blood 13,936,1958

Gibson,Q

The Reduction of Methemoglobin in Red Blood
Cells and Studies of Idiopathic Methemoglo-
binemia. J.Biochem.42,13,1948

Hanngren,A Hannson,E Svartz,N Ullberg,S

Distribution and Metabolism of Salicylazo-
sulphapyridine.
Acta med.Scand. 173,392,1963

- Hellner,H Nissen,R Vosschulte,K
Lehrbuch der Chirurgie
5.Aufl. 588,1967 Georg Thieme Verlag
Stuttgart
- Heubner,W
Methämoglobinbildende Gifte
Ergebn.Physiol. 43,9,1940
- Heubner,W Kiese,M Stuhlmann,M Schwartzkopf-Jung,W.
Der Hämiglobingehalt normalen Blutes.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharm.
204,313,1947
- Huennekens,F Caffrey,R Basford,R Gabrio,B
Methemoglobinreduktase
J.biol.chem. 227,261,1957
- Hultquist,D.E. Passon,P.G.
Catalysis of Methemoglobin reduction by
erythrocyte,cytochrom b_5 and cytochrom b_5 -
reductase.
Nature New.Biol. 229,252,1971
- Horschler,H
Die Toxizität der Sulfanilamid Derivate für
das Blut und das blutbildende System im
Tierversuch.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharm.
242,438,1941
- Jaffee,E.R Heller,P
Methemoglobinemia in man
Progr.Hemat. 4,48,1964
- Jandl,J. Engle,L. Wallen,D.
Oxidative hemolysis and precipitation of
hemoglobin.Heinz body anemias as an accel-
eration of red Cell aging.
J.clin.Invest.. 39,1818,1960

Karlson,P

Kurzes Lehrbuch der Biochemie
5,171,1966 Georg Thieme Verl.Stuttgart

Kiese,M. Kurz,H. Schneider,C.

Chronische Hämoglobinämie durch patholo-
gischen Blutfarbstoff.
klin.Wschr. 29,648,1951

Krücke,W

Zur pathologischen Anatomie der Sulfonamid-
schädigung bei Injektion in den Subarach-
noidalraum. Nervenarzt 18,319,1947

Löhr,G. Waller,H.

Quantitative Fermentbestimmungen in roten
Blutzellen. klin.Wschr. 17,871,1957

Marquart,P.

Zur Nitritaffäre
Dtsch.med.Wschr. 83,772,1958

Michot,F. Marti,H.R.

Der Einfluss von Methämoglobin auf die
Glutathionreduktase der Erythrocyten.
Clin.Chim.Acta 13,269,1966

Morgan,J. Marsden,C. Coburn,J. Mungavin ,J.

Behandlung von Dermatitis herpetiformis
mit Dapsone. Lancet 268,1197,1955

Moser,P. Krause,P.

Sulfonamidcyanose,Plasmolemmflecke und
Heinzkörperbildung.
Naunyn-Schmiedebergs Arch.exp.Path.Pharm.
211,468,1950

Moser,K. Pantlitschko,M. Weippl,G.

Erythrocytenstoffwechsel bei kongenitalem
Methämoglobinreduktasemangel.
klin.Wschr. 23,1260,1968

Rajagopalan, R. Rao, R.

Acute Dapsone Poisoning

J.Indiana med.Ass. 49, No. 9, 439, 1968

Richterich, R

Klinische Chemie, Theorie und Praxis

2. Aufl. Akadem. Verlagsgesellschaft Frankf./M

1968

Ross, J.

Deficient Activity of DPNH-dependent Met-
hemoglobin Diaphorase in Cord Blood

Erythrocytes. Blood 21, 51, 1963

Roth, J. L. A. Colitis ulcerosa

In Gastroenterology, 2. Aufl. S. 870

Bockus, H. L., Ed. Philadelphia und

London 1964

Sandner, U.

Methämoglobinämien und Innenkörperanämien
als Sulfonamidnebenwirkungen bei jungen
Säuglingen.

Kinderärztl. Praxis 30, 163, 1960

Schwarz, K. Speck, M.

Experimentelle Untersuchungen zur Spezifität
der Sensibilisierung gegen Phenylhydroxyl-
amin.

Int. Arch. Allergy 16, 163, 1960

Scott, E. Griffith, J.

The enzymic defect of hereditary Methemo-
globinemia: Diaphorase.

biochem. biophys. Acta 34, 584, 1959

Scott, E.

The Relation of Diaphorase of Human Erythro-
cytes to inheritance of Methemoglobinemia.

J. clin. invest. 39, 1176, 1960

- Scott,E. Mc Graw,J.
Purification and Properties of Diphospho-
pyridine Nucleotide Diaphorase of Human
Erythrocytes.
J.of biol.chem. 237,249,1962
- Shepard,Ch. McRae,D. Habas,J.
Sensitivity of Mycobacterium leprae to low
levels of 4,4'-Diaminodiphenylsulfone.
Proc.Soc.exp.Biol. 122,No.3 ,893,1966
- Smith,R. Alexander,S.
Heinz-body Anaemia Due to Dapsone.
Brit.Med.J. 1,625 (March) 1959
- Spriggs,A. Smith,R. Griffith,H. Truelove,S.
Heinz-Body Anaemia due to Salicylazo-
sulphapyridine.
Lancet 1,1039,1958
- Svartz,N.
Ett nytt sulfonamidpreparat.
Nord.med. 9,554,1941
- Svartz,N.
Salazopyridin a new sulfanilamide preparation
Acta med.Scand. 110,557,1942
- Svartz,N.
Treatment of 124 cases of ulcerative colitis
with Salazopyridine and attempts of desensi-
bilization in cases of Hypersensitiveness
to Sulfa.
Acta med.Scand.Suppl.206,465,1948
- Thauer,K. Meiforth,A. Uehleke,H.
Methämoglobinbildung durch Sulfonamide im
Systemleberhomogenat,Erythrocyten,NADPH und
Sauerstoff.Naunyn-Schmiedeb.Arch.exp.Path.
Pharm. 252,291,1965

- Tönz, O. Simon, H. Hasselfeld, W.
Untersuchung einer großen Hämoglobin-M-Sippe
Schw.Med.Wschr. 42, 1311, 1962
- Tönz, O.
The congenital methemoglobinemias
Bibliotheka Haematologica
Karger Verlag Basel und New York 1968
- Townes, P. Morrison, M.
Investigation of the defect in a variant of
hereditary methemoglobinemia.
Blood 19, 60, 1962
- Uehleke, H.
Biologische Oxidation und Reduktion am
Stickstoff aromatischer Amino- und Nitro-
derivate und ihre Folgen für den Organismus.
In Jucker, E. Ed.: Fortschritte der Arznei-
mittelforschung Bd. 8 195 Basel, Birk-
häuser 1964
- Waller, H. Benöhr, H. Heuer, B. Nerke, O.
Die Glutathionreduktion in Erythrocyten von
Gesunden und Enzymdefektträgern.
klin.Wschr. 48, 79, 1970
- Warburg, O. Kubowitz, F. Christian, W.
Kohlenhydratverbrennung durch Methämoglobin
Biochem.Z. 221, 494, 1930
- Watkinson, G.
Die ärztl. Behandlung der Colitis ulcerosa
Med.klin. 57, 1469, 1962
- Wendel, W.
Oxidation by erythrocytes and the catalytic
influence of methylenblue, Methemoglobin
and the effect of cyanide.
J.biol.Chem. 102, 385, 1933

Worathumrong, N. Grimes, A. J.

Inhibition of Methemoglobin reduction by
Sodium Salicylate.

Brit. J. of haematol. 23, 323, 1972

D Anhang

Danksagung

Dem Direktor der Medizinischen Universitätsklinik Marburg/L. Herrn Prof.Dr.med.G.A.Martini,danke ich, daß mir die Durchführung der Arbeit an seiner Klinik ermöglicht wurde.

Bei Frau Prof.Dr.med.A.Englhardt möchte ich mich ganz besonders für die Überlassung des Themas und für Ihre Hilfe bei der Durchführung der Arbeit bedanken.

Für die Überlassung der Patientenkartei der Colitis Ambulanz und der Unterstützung danke ich ganz besonders Herrn B.Miller.

Meine vorklinischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

Dimroth, Golenhofen, Hensel, Karlson, Mahr, Mattes, Petry, Rohen, Seidel, v. Stosch, Vogt, Walcher, Zilliken.

Meine klinischen Lehrer waren die Herren Professoren und Dozenten:

in Marburg: Beckmann, Berendes, Bommer, Dölle, Hardewig, Hess, Heuser, Hildebrandt, Hort, Koch, Korb, Koransky, Kreutz, Linneweh, Mann, Martini, Pots, Schleyer, Schlosser, Schmid, Schmitz-Moormann, Siegert, Stohmeyer, Voss.

in Graz: Gotsch, Hofmann, Köle, Möse, Moser, Musger, Navratil, Reiffenstuhl, Reisner, Spath.

